

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
27 mai 2004 (27.05.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2004/044204 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :

C12N 15/13, C07K  
16/18, C12N 15/63, 1/21, G01N 33/53, A61K 39/395,  
A61P 25/28, C07K 14/47, G01N 33/68

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/003319

(22) Date de dépôt international :

6 novembre 2003 (06.11.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02/13866 6 novembre 2002 (06.11.2002) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : IN-  
STITUT PASTEUR [FR/FR]; 28 rue du Docteur Roux,  
F-75724 Paris cedex 15 (FR). CENTRE NATIONAL DE  
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue  
Michel-Ange, F-75794 Paris cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :  
ROUGEON, François [FR/FR]; 36 rue Fontaine, F-92310  
Sevres (FR). LAFAYE, Pierre [FR/FR]; 31 Boulevard  
Camelinat, F-92240 MALAKOFF (FR).

(74) Mandataire : CABINET ORES; 36, rue de St Péters-  
bourg, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,  
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (BW, GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

WO 2004/044204 A2

(54) Title: VARIABLE FRAGMENTS OF SINGLE-CHAIN CAMELIDE ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR DIAG-  
NOSING AND TREATING VARIOUS PATHOLOGIES

(54) Titre : FRAGMENTS VARIABLES D'ANTICORPS DE CAMELIDES A CHAÎNE UNIQUE ET LEURS APPLICATIONS  
POUR LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DIVERSES.

(57) Abstract: The invention concerns variable fragments of single-chain camelide antibodies and uses thereof for diagnosing and  
treating various pathologies associated with molecules identified by said antibodies.

(57) Abrégé : Fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique ainsi que leurs applications pour le traitement ou le  
diagnostic des pathologies associées aux molécules reconnues par ces anticorps.

**FRAGMENTS VARIABLES D'ANTICORPS DE CAMELIDES A CHAÎNE  
UNIQUE ET LEURS APPLICATIONS POUR LE DIAGNOSTIC ET LE  
TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DIVERSES**

La présente invention est relative à des fragments variables d'anti-  
5 corps de camélidés à chaîne unique ainsi qu'à leurs applications pour le traitement ou  
le diagnostic des pathologies associées aux molécules reconnues par ces anticorps.

De manière plus précise, la présente invention est relative à :

- des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique  
dirigés contre des agents pathogènes, qui ne secrètent pas de toxines et plus  
10 particulièrement à des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique  
dirigés contre au moins une molécule d'adhésion et notamment la phosphorylcholine  
(VHH-anti-phosphorylcholine) associée aux surfaces des agents pathogènes  
retrouvées dans les infections mucosales ainsi qu'à leurs applications dans le  
diagnostic et le traitement des maladies infectieuses correspondantes ;
- 15 - des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique  
dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 (A $\beta$ 42) (VHH-A $\beta$ 42), ainsi qu'à leurs appli-  
cations pour le diagnostic et le traitement de pathologies non infectieuses comprenant  
le dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes (produits  
dérivés de constituants cellulaires comme des produits dérivés de protéines  
20 insolubles), et plus particulièrement pour le diagnostic et le traitement des maladies  
neuroagréatives comme la maladie d'Alzheimer.

Au sens de la présente invention, on entend par :

- maladies infectieuses, des maladies induites par des agents  
pathogènes (virus ou bactéries), à l'exclusion des bactéries productrices de toxines ;  
25 de manière plus précise, il s'agit d'infections mucosales, dans lesquelles on observe  
l'expression, à la surface des bactéries induisant lesdites infections, d'au moins une  
molécule d'adhésion et notamment de phosphorylcholine.
- maladies non-infectieuses dans lesquelles on observe un dépôt de  
substances amyloïdes insoluble, notamment les maladies suivantes : des maladies  
30 chroniques inflammatoires, le myélome multiple, la macroglobulinémie, la poly-  
neuropathie amyloïde familiale, la cardiomyopathie familiale, l'amylose sénile  
systémique, la polynéphropathie amyloïde familiale, l'amylose familiale, le syndrome

de Gerstmann-Straussler-Scheinker, la néphropathie amyloïde familiale avec urticaire et surdité (syndrome de Muckle-Wells), le carcinome médullaire de la thyroïde, le dépôt amyloïde isolé des oreilles, l'amylose associée à l'hémodialyse (HAA) et les maladies neuroaggr gatives ou neurodégénératives associées à la présence de dépôts amyloïdes (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, etc...).

La maladie d'Alzheimer est un désordre neurodégénératif ou neuroaggr gatif qui affecte 1 à 6 % de la population âgée de plus de 65 ans. L'une de ses caractéristiques est la présence de plaques séniles qui contiennent du  $\beta$ -amyloïde, produit toxique dérivé de la protéine  $\beta$ APP ( $\beta$  Amyloid Precursor Protein), constitué de peptides de 39 à 42 acides aminés (peptides A $\beta$ ), engendrés par le clivage de la  $\beta$ APP par des sécrétases. Les mécanismes responsables de la toxicité du  $\beta$ -amyloïde ne sont pas connus et la relation entre le  $\beta$ -amyloïde et la pathologie n'est pas élucidée.

Jusqu'à maintenant, il n'existe pas de traitement de la maladie d'Alzheimer mais l'immunothérapie à base d'anticorps semble être une voie extrêmement prometteuse. En effet, dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (souris transgéniques pour la protéine  $\beta$ APP), il a été montré que l'immunisation par le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 (peptide A $\beta$ 42) empêche le dépôt cérébral de  $\beta$ -amyloïde chez les jeunes souris, élimine les dépôts de  $\beta$ -amyloïde chez les souris âgées et surtout prévient les pertes de mémoire chez ces souris (Schenk et al., *Archives of Neurology*, 2000, 57 : 934-936 ; Weiner et al., *Annals of Neurology*, 2000, 48): 567-579 ; Janus et al., *Nature*, 2000, 408 : 979-982 ; Morgan et al., *Nature*, 2000, 408: 982-9857; Bard, F., et al., *Nature Medicine*, 2000, 6: 916-9 ; Solomon et al., *P.N.A.S.*, 1997, 94 : 4109-4112). La Demande Internationale PCT WO 02/074240 préconise également l'immunothérapie passive (administration d'anticorps anti-amyloïdes), dans la mesure où les vaccins à base de peptide A $\beta$ 42 se sont révélés inflammatoires. Les anticorps préconisés sont des immunoglobulines classiques, produites par les techniques d'ADN recombinant ou par synthèse chimique.

Deux mécanismes non-exclusifs ont été proposés pour expliquer l'action des anticorps anti-A $\beta$ 42 :

- un effet direct des anticorps à l'intérieur du cerveau (Bard et al., précité; Solomon et al., *DNA & Cell Biology*, 2001, 20 : 697-703) ; les anticorps se

fixeraient au peptide A $\beta$ 42 du cerveau d'une manière qui empêche la conversion de la forme soluble du peptide en la forme insoluble trouvée sur les plaques (Solomon et al., 2001, précité). Cette hypothèse est appuyée par les travaux sur l'immunisation contre la protéine du prion (Peretz et al., *Nature*, 2001, 412: 739-743),

- 5                   - un effet indirect sur les échanges dynamiques du peptide A $\beta$ 42 entre le sang et le cerveau (DeMattos, R.B., et al., *P.N.A.S.*, 2001, 98: 8850-8855) ; les anticorps anti-A $\beta$ 42 ne pénétreraient pas dans le cerveau, mais agiraient plutôt à la périphérie. Le peptide A $\beta$ 42 semble passer la barrière hémato-encéphalique par transport actif et être en situation d'équilibre entre le cerveau et le sang. En se fixant  
10 aux peptides A $\beta$ 42 en solution dans le sang, les anticorps pourraient modifier cet équilibre, causant la séquestration du peptide A $\beta$ 42 dans le sang ou peut-être son extraction du cerveau.

Toutefois, les anticorps monoclonaux de souris ou leurs fragments (scFv) présentent les inconvénients suivants pour une utilisation en thérapie humaine :

- 15                   - les anticorps monoclonaux de souris qui sont immunogènes chez l'Homme ne peuvent pas être administrés de façon répétée, sur une longue période, et  
                    - les fragments scFv sont peu solubles et peu stables *in vivo*.

Afin de traiter plus efficacement les maladies comprenant le dépôt de substances amyloïdes et notamment les maladies neuroagréatives telles que la  
20 maladie d'Alzheimer, il existe un réel besoin de disposer de nouveaux anticorps mieux adaptés aux besoins de la pratique.

Par ailleurs, certaines maladies infectieuses sont dues à des espèces bactériennes qui expriment au moins une molécule d'adhésion et notamment de la phosphorylcholine à leur surface et colonisent les muqueuses (pathogènes primaires,  
25 pathogènes occasionnels ou pathogènes commensales). Les infections mucosales sont la première étape d'infections invasives (bactériémies et méningites) : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Streptococcus pneumoniae*. En raison des polyrésistances aux antibiotiques et de l'absence de vaccins efficaces, notamment en raison de la variabilité de certaines espèces (*N. meningitidis* et *S. pneumoniae*), il  
30 existe un réel besoin de traitements alternatifs de ces infections, ainsi que d'un diagnostic rapide.

Les camélidés (chameaux, dromadaires, lamas, alpagas, etc...) ont la particularité de posséder à la fois des immunoglobulines classiques possédant deux chaînes lourdes et deux chaînes légères et des immunoglobulines dénommées immunoglobulines à chaîne lourde (HCAbs) ou immunoglobulines à chaîne unique 5 qui possèdent deux chaînes lourdes mais pas de chaînes légères (Pour une revue voir NGUYEN et al., *Advances in Immunology*, 2001, 79: 261-296 et Muyldermans et al., *Reviews in Molecular Biotechnology*, 2001, 74: 277-302). Leur chaîne lourde qui possède un poids moléculaire compris entre 43 kDa et 47 kDa selon les espèces, est constituée d'un domaine variable (VHH) d'environ 16 kDa, séparé de deux domaines 10 constants (CH2 et CH3) par une région charnière. Leur paratope (domaine de liaison à l'antigène) est constitué d'un seul domaine variable (VHH). Malgré l'absence de diversité due à la combinatoire entre les domaines variables des chaînes lourdes et légères (VH-VL), ces anticorps à chaîne unique possèdent une grande capacité de reconnaissance des antigènes grâce à des CDRs qui possèdent un nombre d'acides 15 aminés plus important que les CDRs « classiques ». La préparation d'anticorps à partir de camélidés immunisés par un antigène (toxine bactérienne ou venin) et le criblage, par la technique d'exposition sur phage (*phage display*), de banques de ces domaines VHH sont décrits dans la Demande EP 0739 981.

Les banques fabriquées à partir de ces domaines VHH uniques 20 contiennent des anticorps fonctionnels qui ont subi une maturation *in vivo*. Les VHH issus de ces banques possèdent une affinité et une spécificité élevées pour l'antigène. En outre, ils sont capables de reconnaître des épitopes peu immunogènes pour les anticorps "classiques" et certains d'entre eux sont des inhibiteurs d'enzyme très puissants grâce à un mécanisme très original ; le CDR 3 qui est beaucoup plus long 25 que la moyenne est capable de former une boucle qui va s'insérer dans le site actif de l'enzyme.

Les VHH, sélectionnés à partir de ces banques, sont bien exprimés, très solubles et très stables. En outre, du fait de leur petite taille et de l'homologie de leurs séquences FR avec celles des immunoglobulines humaines, les VHH sont peu 30 immunogènes chez l'Homme.

En conséquence, les VHH offrent des perspectives incontestables pour le diagnostic et le traitement de pathologies humaines ou animales, par rapport aux anticorps monoclonaux ou aux fragments d'anticorps conventionnels (ScFv).

En outre, pour ce qui concerne les infections dans lesquelles on observe l'expression d'au moins une molécule d'adhésion et notamment de phosphorylcholine à la surface des agents pathogènes, l'administration de tels anticorps, notamment par voie topique (intranasale, dans le cas des agents pathogènes respiratoires) présentent les avantages supplémentaires suivants :

- efficacité jusqu'à cent fois supérieure à celle de l'administration parentérale
- activité immédiate
- traitement ciblé au site même de l'infection
- facilité d'administration et bonne tolérance
- peu ou pas d'interférence avec le système immunitaire de l'hôte
- adaptation rapide de la préparation d'anticorps à tout nouveau variant antigénique
- peu de risque de sélection de variants résistants.

En conséquence, la présente invention a pour objet l'utilisation d'anticorps à chaîne unique de camélidés, sélectionnés dans le groupe constitué par des anticorps comprenant des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes ne sécrétant pas de toxine ou ne contenant pas la protéase NS3 de l'HCV et des anticorps comprenant des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, pour la détection de la présence d'un agent pathogène ne sécrétant pas de toxine ou ne contenant pas la protéase NS3 de l'HCV ou pour la détection d'une maladie comprenant des dépôts de substances amyloïdes insolubles.

Les Inventeurs ont préparé une banque de fragments variables d'anticorps de camélidés, dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 (banque VHH-A $\beta$ 42) ; à partir de cette banque, les Inventeurs ont isolé des fragments d'anticorps qui répondent mieux aux besoins de la pratique en ce qu'ils présentent les propriétés suivantes :

- ils se lient spécifiquement au peptide 1-42 du précurseur de la protéine  $\beta$ -amyloïde avec une affinité élevée,

- ils possèdent un faible poids moléculaire et sont solubles,

- ils sont très stables, et

5 - ils sont peu immunogènes.

Les fragments variables d'anticorps à chaîne unique anti-A $\beta$ 42 représentent des candidats pour une immunothérapie des maladies comprenant le dépôt de substances amyloïdes dans au moins un organe ou tissu et notamment de la maladie d'Alzheimer. En outre, ils sont utiles pour le diagnostic de cette maladie ; par  
10 exemple des VHH marqués peuvent être utilisés en imagerie médicale.

En conséquence, la présente invention a pour objet une banque immune d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 (SEQ ID NO: 1), déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724  
15 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2937.

La banque immune d'ADNc VHH-A $\beta$ 42 selon l'invention est préparée à partir de lymphocytes de camélidés immunisés par le peptide A $\beta$ 42, par clonage de fragments VHH, comme décrit dans la Demande EP 0739981.

La présente invention a également pour objet un fragment variable  
20 d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigé contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, caractérisé en ce qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture de la banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps VHH-A $\beta$ 42 telle que définie ci-dessus, dans des conditions permettant l'expression  
25 desdits fragments variables,

- la mise en contact desdits fragments variables avec le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 (A $\beta$ 42), dans des conditions permettant la liaison dudit fragment variable d'anticorps avec ledit peptide, et

- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables  
30 d'anticorps capables de se lier audit peptide.

Les conditions de culture de la banque d'ADNc et d'incubation des fragments variables avec le peptide A $\beta$ 42 sont des conditions classiques connues en elles-mêmes de l'Homme du métier.

Conformément à l'invention, lesdits fragments variables d'anticorps à chaîne unique sont issus de n'importe quel animal de la famille des camélidés, par exemple de chameau, dromadaire, lama ou d'alpaga.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit fragment variable d'anticorps, il présente une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 3, 5, 7 et 9.

La présente invention a également pour objet un anticorps ou un fragment d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une molécule d'ADNc, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé tel que défini ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite molécule d'ADNc, elle présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 2, 4, 6 et 8.

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins une molécule d'ADNc telle que définie ci-dessus.

De nombreux vecteurs où l'on peut insérer une molécule d'acide nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte eucaryote ou procaryote, sont connus en eux-mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple répllication de la séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de la séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte), ainsi que de la nature de la cellule hôte.

De préférence, ledit vecteur est un vecteur d'expression procaryote ou eucaryote, comprenant au moins une cassette d'expression comprenant l'ADNc codant les fragments variables d'anticorps (VHH-A $\beta$ 42) tels que définis ci-dessus, placé sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié, notamment un promoteur permettant l'expression desdits fragments VHH-A $\beta$ 42 dans des cellules



hôtes modifiées. Avantageusement, ledit ADNc est cloné dans ledit vecteur, en phase avec une séquence étiquette, éventuellement clivable (épitope, séquence polyHistidine...); une telle construction permet de produire ledit fragment VHH-A $\beta$ 42 sous forme d'une protéine de fusion qui est ensuite purifiée sur une colonne appropriée.

5 (colonne d'immunoaffinité ou colonne de nickel), ladite séquence étiquette pouvant éventuellement être clivée par tout moyen approprié.

La présente invention a également pour objet une cellule hôte eucaryote ou procaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par une molécule d'acide nucléique ou un vecteur tels que définis ci-dessus.

10 Selon un mode de réalisation avantageux de ladite cellule hôte modifiée, elle a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2933 ; ladite cellule hôte exprime le fragment VHH-A $\beta$ 42 de séquence SEQ ID NO: 3.

15 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite cellule hôte modifiée, elle a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2934 ; ladite cellule hôte exprime le fragment VHH-A $\beta$ 42 de séquence SEQ ID NO: 5.

20 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite cellule hôte modifiée, elle a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2935 ; ladite cellule hôte exprime le fragment VHH-A $\beta$ 42 de séquence SEQ ID NO: 7.

25 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite cellule hôte modifiée, elle a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2936 ; ladite cellule hôte exprime le fragment VHH-A $\beta$ 42 de séquence SEQ ID NO: 9.

30 Les molécules d'acide nucléique selon l'invention sont obtenues par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes, en suivant les protocoles standards tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M.

AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA). Par exemple, elles peuvent être obtenues par amplification d'une séquence nucléique par PCR ou RT-PCR ou bien par synthèse chimique totale ou partielle.

Les techniques de production et de purification de protéines recombinantes, les méthodes d'immunisation et de production d'anticorps et les techniques immunologiques reposant sur la détection de complexes antigène-anticorps (ELISA, RIA, Western-Blot) sont connues en elles-mêmes ; à titre d'exemple on peut citer celles décrites dans *Current Protocols in Molecular Biology*, précité et dans *Current protocols in Immunology* (John E. Coligan, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

Du fait de leurs propriétés telles que définies ci-dessus, les fragments variables d'anticorps (VHH-A $\beta$ 42) selon l'invention sont utiles pour le diagnostic et le traitement des maladies comprenant un dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes, et notamment des maladies neuroagréatives comme la maladie d'Alzheimer.

En conséquence la présente invention a pour objet l'utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH-A $\beta$ 42 ou bien d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps dérivés, tels que définis ci-dessus pour la préparation d'un réactif de diagnostic destiné à la détection de maladies comprenant le dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes insolubles, et notamment des maladies neuroagréatives comme la maladie d'Alzheimer.

Ladite détection peut-être effectuée par toute technique appropriée, notamment par des techniques d'imagerie médicale.

La présente invention a également pour objet un kit de diagnostic de maladies comprenant le dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes insolubles, et notamment des maladies neuroagréatives comme la maladie d'Alzheimer, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-A $\beta$ 42 ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant ledit fragment variable d'anticorps, tels que définis ci-dessus.

La présente invention a en outre pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-A $\beta$ 42 ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant

ledit fragment variable d'anticorps, tels que définis ci-dessus, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention a également pour objet l'utilisation des anticorps VHH-A $\beta$ 42 tels que définis ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies comprenant le dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, lesdites maladies sont des maladies neuroagréatives, notamment la maladie d'Alzheimer.

10 Du fait de leurs propriétés telles que définies ci-dessus, les fragments variables d'anticorps (VHH-A $\beta$ 42) selon l'invention présentent les avantages suivants par rapport aux anticorps ou fragments d'anticorps existants :

- ils sont produits facilement, en grande quantité, à un coût peu élevé,
- 15 - ils se lient au peptide A $\beta$ 42 de façon spécifique et avec une affinité élevée,
- ils possèdent une demi-vie importante,
- ils n'induisent pas de réponse immunitaire du type HAMA (Human anti-mouse antibody) et peuvent donc être administrés chez un patient humain ou 20 animal, de façon répétée sur une longue durée.

Par ailleurs, les fragments variables d'anticorps à chaîne unique anti-molécules d'adhésion et plus particulièrement anti-phosphorylcholine représentent des candidats pour une immunothérapie des maladies infectieuses telles que définies ci-dessus, i.e. dues à des agents pathogènes exprimant à leurs surfaces au moins une 25 molécule d'adhésion et notamment la phosphorylcholine ; les maladies concernées sont notamment les maladies infectieuses mucosales des voies respiratoires.

En conséquence, la présente invention a également pour objet un fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigé contre des agents pathogènes ne sécrétant pas de toxines, caractérisé en ce qu'il est capable de 30 reconnaître les agents pathogènes ou des fragments de ceux-ci à l'intérieur ou à l'extérieur de cellules eucaryotes ou de tissus ou d'organes de mammifères et en ce

qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture d'une banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes, exprimant à leurs surfaces des molécules d'adhésion de la paroi bactérienne, dans des conditions permettant l'expression desdits fragments variables,
- la mise en contact desdits fragments variables d'anticorps avec au moins une molécule d'adhésion ou des agents pathogènes exprimant à leur surface des molécules d'adhésion, dans des conditions permettant la liaison desdits fragments variables d'anticorps avec au moins une desdites molécules d'adhésion, et
- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables d'anticorps VHH-anti-molécule d'adhésion capables de se lier à la molécule d'adhésion correspondante.

La molécule d'adhésion est de préférence la phosphorylcholine ; dans ce cas, la présente invention a également pour objet un fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigé contre des agents pathogènes, à l'exclusion des bactéries produisant des toxines et à l'exclusion des toxines correspondantes, caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître les agents pathogènes ou des fragments de ceux-ci à l'intérieur ou à l'extérieur de cellules eucaryotes ou de tissus ou d'organes de mammifères et en ce qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture d'une banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes, exprimant à leurs surfaces de la phosphorylcholine (VHH-anti-phosphorylcholine), dans des conditions permettant l'expression desdits fragments variables,
- la mise en contact desdits fragments variables d'anticorps avec de la phosphorylcholine ou des agents pathogènes exprimant à leur surface de la phosphorylcholine, dans des conditions permettant la liaison desdits fragments variables d'anticorps avec la phosphorylcholine, et
- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine, capables de se lier à la phosphorylcholine.

On entend, au sens de la présente invention, par anticorps VHH-anti-phosphorylcholine :

- des anticorps dirigés contre des agents pathogènes présentant à leur surface de la phosphorylcholine, ou dirigés contre la phosphorylcholine,
- 5       - lesdits anticorps reconnaissant la phosphorylcholine dans n'importe quel environnement.

Les conditions de culture de la banque d'ADNc et d'incubation des fragments variables avec la phosphorylcholine sont des conditions classiques connues en elles-mêmes de l'Homme du métier.

- 10       Conformément à l'invention, lesdits fragments variables d'anticorps à chaîne unique (VHH-anti-molécules d'adhésion ou VHH-anti-phosphorylcholine) sont issus de n'importe quel animal de la famille des camélidés, par exemple de chameau, dromadaire, lama ou d'alpaga.

- 15       Selon un mode de réalisation avantageux dudit fragment variable d'anticorps (VHH-anti-phosphorylcholine), il présente une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO :29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 et 49.

- 20       La banque immune d'ADNc VHH-anti-molécules d'adhésion ou VHH-anti-phosphorylcholine selon l'invention est préparée à partir de lymphocytes de camélidés immunisés soit par des agents pathogènes présentant à leur surface de la phosphorylcholine, soit par de la phosphorylcholine éventuellement couplée à une protéine porteuse telle que la KLH ou la sérum albumine, par clonage de fragments VHH, comme décrit dans la Demande Européenne n° 0 739 981.

- 25       La présente invention a également pour objet un anticorps ou un fragment d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable VHH-anti-molécule d'adhésion et notamment VHH-anti-phosphorylcholine, tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une molécule d'ADNc, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé tel que défini ci-dessus.

- 30       Selon un mode de réalisation avantageux de ladite molécule d'ADNc, elle présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 et 48.

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins une molécule d'ADNc telle que définie ci-dessus.

De nombreux vecteurs où l'on peut insérer une molécule d'acide  
5 nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte eucaryote ou procaryote, sont connus en eux-mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple répllication de la séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de la séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte),  
10 ainsi que de la nature de la cellule hôte.

De préférence, ledit vecteur est un vecteur d'expression procaryote ou eucaryote, comprenant au moins une cassette d'expression comprenant l'ADNc codant les fragments variables d'anticorps (VHH-anti-phosphorylcholine) tels que définis ci-dessus, placé sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié,  
15 notamment un promoteur permettant l'expression desdits fragments VHH-anti-phosphorylcholine dans des cellules hôtes modifiées. Avantagusement, ledit ADNc est cloné dans ledit vecteur, en phase avec une séquence étiquette, éventuellement clivable (épitope, séquence polyHistidine...) ; une telle construction permet de produire ledit fragment VHH-anti-phosphorylcholine sous forme d'une protéine de  
20 fusion qui est ensuite purifiée sur une colonne appropriée (colonne d'immunoaffinité ou colonne de nickel), ladite séquence étiquette pouvant éventuellement être clivée par tout moyen approprié.

La présente invention a également pour objet une cellule hôte eucaryote ou procaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par une molécule d'acide  
25 nucléique ou un vecteur tels que définis ci-dessus.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la paroi bactérienne, pour la préparation d'un réactif de diagnostic destiné à la détection des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment au moins une  
30 molécule d'adhésion à leur surface.

Dans le cas où la molécule d'adhésion est la phosphorylcholine, la présente invention a pour objet l'utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH-

anti-phosphorylcholine ou bien d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps dérivés, tels que définis ci-dessus pour la préparation d'un réactif de diagnostic destiné à la détection des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment de la phosphorylcholine à leur surface et notamment des maladies infectieuses des voies  
5 respiratoires.

Ladite détection peut-être effectuée par toute technique appropriée, notamment par des techniques d'imagerie médicale.

La présente invention a également pour objet un kit de diagnostic des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment de la  
10 phosphorylcholine à leur surface et notamment des maladies infectieuses des voies respiratoires, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant ledit fragment variable d'anticorps, tels que définis ci-dessus.

La présente invention a en outre pour objet une composition  
15 pharmaceutique comprenant des anticorps de camélidés dirigés contre des agents pathogènes ou leurs fragments, caractérisée en ce qu'ils ne secrètent pas de toxine et en ce qu'ils ne sont pas des éléments constitutifs de la protéase NS3 de HCV.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment variable  
20 d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la paroi bactérienne selon l'invention.

Dans le cas où la molécule d'adhésion est la phosphorylcholine, la présente invention a pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphoryl-  
25 choline ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant ledit fragment variable d'anticorps, tels que définis ci-dessus, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Conformément à l'invention ladite composition est avantageusement associée à des véhicules pharmaceutiquement acceptables appropriés à une  
30 administration intranasale.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la

paroi bactérienne, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment au moins une molécule d'adhésion à leur surface.

Dans le cas où la molécule d'adhésion est la phosphorylcholine, la présente invention a également pour objet l'utilisation des anticorps VHH-anti-phosphorylcholine tels que définis ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment de la phosphorylcholine à leur surface.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, lesdites maladies sont des maladies infectieuses qui colonisent les muqueuses et plus particulièrement des maladies infectieuses des voies respiratoires.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de la banque de VHH anti- $\beta$ 42 selon l'invention, ainsi qu'au Tableau I illustrant les séquences de la Demande et aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre la cinétique en ELISA, des anticorps sériques spécifiques chez les alpagas immunisés avec le peptide A $\beta$ 42. Les valeurs représentent la densité optique à 295 nm des sérums dilués au 1/3200, respectivement aux jours J<sub>0</sub>, J<sub>35</sub>, J<sub>77</sub> et J<sub>131</sub> du protocole d'immunisation.

- la figure 2 illustre la diversité de la banque de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique, spécifiques du peptide A $\beta$ 42 (VHH anti-A $\beta$ 42), analysée sur 6 clones (VHH-03, VHH-05, VHH-07, VHH-25, VHH-11 et VHH-33, respectivement SEQ ID NO : 26, 24, 22, 23, 25 et 27) pris au hasard.

- la figure 3 illustre la séquence en acides aminés des VHHs des clones VHH ALZ-61, VHH ALZ-L35, VHH ALZ L1-3, VHH ALZ V31-1 (SEQ ID NO: 3, 5, 7 et 9). Les séquences indiquées en gras correspondent respectivement au CDR1, CDR2 et CDR3.

- la figure 4 illustre la liaison des VHHs solubles des clones VHH ALZ-61, VHH ALZ-L35, VHH ALZ L1-3, VHH ALZ V31-1 au peptide A $\beta$ 42, analysée par un test ELISA direct.



- la figure 5 illustre la formule GPB-synthon utilisée pour le criblage des banques : PC liée à N-acétyl glucosamine (GalNac) couplée à la biotine via un pont disulfure.

- la figure 6 illustre les séquences nucléotidiques des VHH anti-phosphorylcholine sélectionnés.

**Tableau I: Séquences de la Demande**

Numéro d'identification	Séquence
SEQ ID NO: 1	peptide A $\beta$ 42
SEQ ID NO: 2	ADNc VHH-61
SEQ ID NO: 3	peptide VHH-61
SEQ ID NO: 4	ADNc VHH-L35
SEQ ID NO: 5	peptide VHH-L35
SEQ ID NO: 6	ADNc VHH-L1-3
SEQ ID NO: 7	peptide VHH-L1-3
SEQ ID NO: 8	ADNc VHH-V31-1
SEQ ID NO: 9	peptide VHH-V31-1
SEQ ID NO: 10	amorces VHBACK A6
SEQ ID NO: 11	amorces CH2FORT A4
SEQ ID NO: 12	amorces VHBACKA4
SEQ ID NO: 13	amorces VHFOR36
SEQ ID NO: 14	amorces LH
SEQ ID NO: 15	ADNc VHH-07
SEQ ID NO: 16	ADNc VHH-25
SEQ ID NO: 17	ADNc VHH-05
SEQ ID NO: 18	ADNc VHH-11
SEQ ID NO: 19	ADNc VHH-17
SEQ ID NO: 20	ADNc VHH-03
SEQ ID NO: 21	ADNc VHH-43
SEQ ID NO: 22	peptide VHH-07
SEQ ID NO: 23	peptide VHH-25
SEQ ID NO: 24	peptide VHH-05

SEQ ID NO: 25	peptide VHH-11
SEQ ID NO: 26	peptide VHH-03
SEQ ID NO: 27	peptide VHH-33
SEQ ID NO:28	ADNc clone 1
SEQ ID NO:29	peptide clone 1
SEQ ID NO:30	ADNc clone 2
SEQ ID NO:31	peptide clone 2
SEQ ID NO:32	ADNc clone 3
SEQ ID NO:33	peptide clone 3
SEQ ID NO:34	ADNc clone 4
SEQ ID NO:35	peptide clone 4
SEQ ID NO:36	ADNc clone 5
SEQ ID NO:37	peptide clone 5
SEQ ID NO:38	ADNc clone 7
SEQ ID NO: 39	peptide clone 7
SEQ ID NO:40	ADNc clone 8
SEQ ID NO:41	peptide clone 8
SEQ ID NO:42	ADNc clone 9
SEQ ID NO:43	peptide clone 9
SEQ ID NO:44	ADNc clone 10
SEQ ID NO :45	peptide clone 10
SEQ ID NO:46	ADNc clone 11
SEQ ID NO:47	peptide clone 11
SEQ ID NO:48	ADNc clone 12
SEQ ID NO:49	peptide clone 12
SEQ ID NO:50	Amorce M13-40
SEQ ID NO:51	Amorce myc seq 10

**Exemple 1 : Préparation d'une banque de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique, spécifiques du peptide A $\beta$ 42 (VHH anti- A $\beta$ 42)**

**1) Immunisation d'alpagas avec le peptide A $\beta$ 42**

Le peptide A $\beta$ 42 (SEQ ID NO: 1) est synthétisé en phase solide  
5 selon la méthode décrite par Merrifield et al. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 85 : 2149).

Un alpaga (*Lama pacos*) a été immunisé avec le peptide A $\beta$ 42 agrégé (ce peptide a tendance naturellement à s'agréger et à former des fibres amyloïdes) en suivant le protocole suivant :

**J<sub>0</sub>: Saignée pré-immune**

10 - J<sub>0</sub>: 200  $\mu$ g de peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant complet de Freund par voie sous-cutanée

- J<sub>10</sub>: 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée

- J<sub>21</sub>: 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par  
15 voie sous-cutanée

**J<sub>35</sub>: saignée 2**

- J<sub>42</sub>: 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée

- J<sub>48</sub>: 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par  
20 voie sous-cutanée

- J<sub>70</sub>: 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée

**J<sub>77</sub>: saignée 3**

- J<sub>101</sub>: prélèvement des lymphocytes

25 - J<sub>101</sub>: 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée

- J<sub>115</sub>: 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée

- J<sub>129</sub>: 200  $\mu$ g peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par  
30 voie sous-cutanée

**J<sub>131</sub> : saignée 4**

La cinétique de la réponse en anticorps sériques spécifiques du peptide Aβ42 est analysée, en ELISA, aux jours J<sub>0</sub>, J<sub>35</sub>, J<sub>77</sub> et J<sub>131</sub>, sur des peptides à la dilution 1/3200.

5 Les résultats présentés à la figure 1 montrent un pic d'anticorps à J77.

**2) Purification des ARNm et synthèse des ADNc**

Les lymphocytes sanguins sont préparés à partir du sang hépariné prélevé à J<sub>131</sub>, par centrifugation en gradient de ficoll. De manière plus précise, le sang  
10 (120 ml) hépariné (25 000 UI d'héparine) est dilué dans du tampon HBSS (120 ml), centrifugé sur un gradient de ficoll, pendant 30 min à 400 g, puis les lymphocytes sont récoltés, lavés trois fois dans du tampon HBSS, centrifugés pendant 5 min à 1000 g. Les lymphocytes ainsi obtenus ( $1,7 \cdot 10^8$  cellules) sont aliquotés ( $3 \cdot 10^7$  cellules par tube) puis les ARNm sont extraits à partir de  $10^7$  lymphocytes, à l'aide du kit  
15 RNAXEL® (Eurobio), en suivant les instructions du fabricant.

L'ADNc est synthétisé à partir de 5 à 10 µg d'ARNm dans les conditions suivantes : 2 µl de β-mercaptoéthanol (1M) et 2 µl de RNAsine 40 U/µl (PROMEGA) sont ajoutés à 20 µl de la préparation d'ARNm purifié et le mélange est incubé 5 min à température ambiante, puis 2 heures à 42 °C, dans un volume de 96 µl  
20 contenant 400 UI de MLV (GIBCO) dans du tampon MLV(GIBCO) 8,33 mM DTT, 500 µM de chacun des dNTPs et 6 à 30 pmoles d'amorce hexanucléotidique aléatoire (PdN6).

Les fragments VHH sont amplifiés par des réactions de PCR imbriquées (*nested PCR*) :

25 - **1<sup>ère</sup> réaction PCR**

Un produit de 600 pb correspondant au fragment VHH-charnière-CH2 est amplifié à l'aide du couple d'amorces :

- VHBAC A6 : 5' GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGRGGAGG 3' (SEQ ID NO: 10)

- CH2FORT A4 : 5' CGCCATCAAGGTACCAGTTGA 3' (SEQ ID NO: 11)

30 De manière plus précise, la réaction PCR est réalisée dans un volume final de 50 µl, en présence de 5 µl d'ADNc, 6 à 30 pmoles de chacune des

amorces, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de chacun des dNTPs et 5 unités de Taq polymérase Hot start (QIAGEN).

L'amplification PCR est réalisée dans les conditions suivantes : une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 15 min est suivie de 40 cycles alternant  
5 une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une étape d'hybridation des amorces à 52°C pendant 30 sec et une étape d'extension à 72°C pendant 30 sec, puis la réaction est terminée par une étape finale d'extension à 72 °C pendant 2 min.

Le produit d'amplification de 600 pb est séparé par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium, dans du tampon TBE (Tris-  
10 Borate-EDTA), extrait du gel et purifié à l'aide du kit Nucleospin Extract (MACHEREY/NAGEL).

**- 2<sup>ème</sup> réaction PCR :**

Un produit d'environ 350 pb correspondant au fragment VHH est amplifié à partir du produit de 600 pb, à l'aide des couples d'amorces suivants :

15 **\* Couple 1 :**

- VHBACKA4 (*Sfi*): 5' CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAKGTSCA  
GCT 3' (SEQ ID NO: 12)

et

- VHFOR36 (*Not*I): 5' GGACTAGTTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCTG 3' (SEQ  
20 ID NO: 13).

**\* Couple 2 :**

- VHBACKA4 (*Sfi*)

et

- LH (*Not*I): 5' GG ACT AGT TGC GGC CGC TGG TTG TGG TTT TGG TGT CTT GGG 3'  
25 (SEQ ID NO: 14)

Le couple 1 amplifie les VHH de tous les isotypes d'immunoglobulines à chaîne unique alors que le couple 2 est spécifique de l'isotype IgG3.

De manière plus précise, la réaction PCR est réalisée dans un volume final de 50 µl, en présence de 5 µl du produit de 600 pb, 10 pmoles de  
30 chacune des amorces, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de chacun des dNTPs et 5 unités de Taq polymérase.

L'amplification PCR est réalisée dans les conditions suivantes : une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 15 min est suivie de 35 cycles alternant une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une étape d'hybridation des amorces à 45°C pendant 30 sec et une étape d'extension à 72°C pendant 60 sec, puis la réaction  
5 est terminée par une étape finale d'extension à 72°C pendant 2 min.

Le produit d'amplification de 350 pb est séparé par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium, dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA), extrait du gel et purifié à l'aide du kit Nucleospin Extract (MACHEREY/NAGEL).

### 10 3) Clonage des ADNc dans le vecteur PHEN 1

Le phagemide PHEN1 (Hoogenbaum et al., *N.A.R.*, 1991, 19: 4133-4137) est purifié à l'aide du kit Nucleobond AX (MACHEREY/NAGEL), digéré par les enzymes *Sfi* I et *Not* I (BIOLABS), en suivant les instruction du fabricant, purifié sur gel d'agarose comme décrit ci-dessus, puis traité à la phosphatase alcaline (CIP).

15 Le phagemide PHEN1 linéarisé et déphosphorylé et le produit d'amplification de 350 pb préalablement digéré par les enzymes *Sfi* I et *Not* I, sont ensuite incubés en présence de ligase, puis des bactéries *E.coli* SURE® sont transformées par électroporation avec le produit de la ligation. Les bactéries transformées sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu 2YT gélosé, additionné de 100 µg/ml d'ampicilline  
20 et de 1 % de glucose. Les colonies résistantes ( $2 \times 10^6$  clones) sont remises en suspension dans du milieu 2YT et la banque est conservée à -80°C dans du glycérol.

La banque ainsi obtenue qui contient des clones incluant un insert VHH amplifié avec le couple d'amorces 1 (sous-banque 1) et des clones incluant un insert VHH amplifié avec le couple d'amorces 2 (sous-banque 2 spécifique de l'isotype  
25 IgG3), est dénommée banque immune VHH ALZ, a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2937.

### 4) Contrôle de la diversité de la banque

L'ADN plasmidique de 12 colonies résistantes est extrait à l'aide du  
30 kit Nucleospin Plasmid (MACHEREY/NAGEL).

La présence d'un insert est contrôlée par restriction enzymatique de l'ADN plasmidique, à l'aide de *Sfi I* et *Not I* (BIOLABS), en suivant les instructions du fabricant.

La diversité de la banque est contrôlée par amplification de l'ADN plasmidique, par PCR à l'aide du couple d'amorces VHBACA4 et VHFOR36 comme décrit ci-dessus puis restriction enzymatique du produit PCR, à l'aide de *Bst NI* (BIOLABS), en suivant les instructions du fabricant et séparation des produits de digestion par électrophorèse en gel d'agarose (3 %). Alternativement, la séquence des inserts est déterminée par séquençage automatique.

Les résultats sont les suivants :

- 90 % des clones ont un insert (VHH-07, VHH-25, VHH-05, VHH-11, VHH-17, VHH-03, VHH-43, VHH-61, VHH-L35, VHH-L1-3, VHH-V31-1 et VHH-33, respectivement SEQ ID NO: 15 à 21, 2, 4, 6 et 8).

- le profil de restriction par *Bst NI* montre une diversité des inserts.

La figure 2 montre que la banque possède une grande diversité étant donné que parmi 6 clones pris au hasard, 5 codent pour des VHH dont les CDRs sont tous différents entre eux (VHH-05, VHH-07, VHH-25, VHH-11 et VHH-33, respectivement SEQ ID NO: 24, 22, 23, 25 et 27) et 1 code pour un VH tronqué sans CDR3 (VHH-03, SEQ ID NO: 26).

**Exemple 2 : Criblage de la banque de VHH anti-A $\beta$ 42 par la technique d'exposition sur phage**

#### 1) Matériels et méthodes

Les phagemides de la banque de VHH anti-A $\beta$ 42 sont encapsidés dans des phages filamenteux (M13) et les phages sont amplifiés et titrés selon les techniques classiques de Biologie moléculaire en suivant les protocoles standard tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA). 3 criblages successifs de la banque de VHH anti-A $\beta$ 42 ont été réalisés par la technique d'exposition sur phage, en suivant le protocole suivant :

#### **- 1<sup>er</sup> criblage**

4 ml de peptide A $\beta$ 42 (25  $\mu$ g/ml) dilué dans du tampon PBS sont répartis dans des immunotubes (maxisorp®, 5 ml, NUNC) puis incubés une nuit à

37°C ou à 4°C. Après 5 lavages dans du PBS, 4 ml de tampon PBS contenant 2 % de lait écrémé (tampon de saturation) sont ajoutés et incubés 2 h à 37°C. Après des lavages avec du tampon PBS,  $10^{12}$  à  $10^{13}$  phages dilués dans 4 ml de tampon PBS contenant 2 % de lait écrémé sont ajoutés et incubés une heure à température ambiante  
5 sur une roue, puis une heure à température ambiante sans agitation. Après 10 lavages avec du tampon PBS contenant 0,1 % de Tween 20 suivis de 10 lavages avec du tampon PBS, 3 ml d'une culture d'*E. coli* TG1 (*supE hsdΔ5thi Δ(lac-proAB)* F' [*traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>r</sup> lacZ* DM15], STRATAGENE), à la densité optique de 0,5, sont ajoutés dans les immunotubes et incubés 45 min à 37°C, sous agitation. A la fin de  
10 l'incubation, les bactéries sont diluées (dilutions  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$ ) dans un volume de 100 µl, étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu 2YTAG gélosé (milieu 2YT additionné de 100 µg/ml d'ampicilline et de 1 % de glucose) et incubées une nuit à 37°C. Le reste de la culture (3 ml) est étalé sur une grande boîte de Pétri contenant le même milieu et incubé une nuit à 30°C.

15                    - 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> criblages

Le lendemain, les bactéries survivantes sont récoltées dans 5 ml de milieu 2YT puis 50 µl sont mis en culture dans 100 ml de milieu 2YTAG et le volume restant est congelée à -80°C dans du glycérol. La culture est incubée à 37°C jusqu'à l'obtention d'une  $DO_{600}$  de 0,5 puis 10 ml de la culture sont infectés par 0,5 ml de  
20 phage auxiliaire (*helper* phage), incubés 130 min à 37°C sans agitation puis centrifugés 10 min à 5000 rpm. Le culot est remis en suspension dans 50 ml de milieu 2YT additionné d'ampicilline (100 µg/ml) et de kanamycine (25 µg/ml) et la suspension obtenue est incubée une nuit à 30°C. Ensuite, 40 ml de cette culture sont centrifugés 10 min à 8000 rpm et le surnageant additionné de 8 ml d'une solution de PEG/NaCl  
25 (20 % PEG 8000, 2,5 M NaCl) est incubé 2 à 4 h à 4°C puis centrifugé 2 fois à 10 min à 8000 rpm. Le culot de phage est remis en suspension dans 2 ml de PBS puis les phages sont titrés comme décrit ci-dessus et 1 ml de phage est criblé sur immunotube, comme décrit pour le 1<sup>er</sup> criblage, à l'exception que la concentration de peptide déposée dans les immunotubes est diminuée et la composition des tampons de saturation et  
30 de lavage des phages non fixés sont modifiés comme indiqué dans le Tableau II ci-dessous :



**Tableau II : Conditions des criblages successifs**

Criblage	Concentration en peptide	Tampon de saturation	Tampon de lavage
1 <sup>er</sup> criblage	25 µg/ml	PBS + 2 % de poudre de lait écrémé	PBS + 0,1 % Tween 20
2 <sup>ème</sup> criblage	12,5 µg/ml	PBS + 0,5 % gélatine	PBS + 0,3 % Tween 20
3 <sup>ème</sup> criblage	12,5 µg/ml	PBS + 3 % BSA	PBS + 0,5% Tween 20

**3) Résultats**

Le rendement de chaque criblage, représenté par la proportion de phages liés au peptide Aβ42 est illustré par le Tableau III ci-dessous.

5

**Tableau III : Rendement des criblages**

Criblage	Nbre total de phages	Nbre de phages liés au peptide Aβ42	Rapport
1 <sup>er</sup> criblage	$2 \times 10^{12}$	$10^9$	$5 \times 10^{-4}$
2 <sup>ème</sup> criblage	$3 \times 10^{13}$	$2 \times 10^{10}$	$6 \times 10^{-4}$
3 <sup>ème</sup> criblage	$10^{14}$	$3,5 \times 10^{13}$	$3 \times 10^{-1}$

La proportion de phages se liant au peptide Aβ42, en ELISA, est illustrée par le Tableau IV ci-dessous :

**Tableau IV : Proportion de phages se liant au peptide Aβ42 en ELISA**

Etat de la banque	Sous-banque 1		Sous-banque 2	
	DO < 0,5	DO > 0,5	DO > 0,5	DO > 0,5
Avant criblage	3/8	0/8	3/8	0/8
Après 1 <sup>er</sup> criblage	3/24	3/24	5/24	0/24
Après 2 <sup>ème</sup> criblage	11/32	2/32	5/35	4/32
Après 3 <sup>ème</sup> criblage	15/64	16/64	27/64	1/64

10

Le Tableau IV indique que la proportion de phages se liant avec une bonne affinité au peptide Aβ42 augmente au cours des criblages successifs.

**Exemple 3 : Production de VHH solubles et analyse de la spécificité et de l'affinité des VHH solubles pour le peptide A $\beta$ 42**

**1) Matériels et méthodes**

**a) Production de VHH solubles**

5 - microculture en plaque à 96 puits

Une colonie de *E. coli* HB2151 (Carter et al., *N.A.R.*, 1991, 19: 4133-4137) contenant le plasmide pHEN-VHH est mise en culture toute la nuit dans un puits d'une microplaque de 96 puits contenant 200  $\mu$ l de milieu 2YT additionné d'ampicilline (100  $\mu$ g/ml) et de glucose 1% (culture I).

10 3  $\mu$ l de la culture I sont ensuite transférés dans un puits d'une microplaque de 96 puits contenant 200  $\mu$ l de milieu 2YT additionné d'ampicilline (100  $\mu$ g/ml) et de glucose 0,1% et la culture est incubée pendant 3 heures à 37°C (culture II).

A la fin de cette incubation, 25  $\mu$ l de milieu 2YT contenant de  
15 l'IPTG 20 mM (soit 2 mM final) sont ajoutés dans les puits et la culture II est ensuite incubée toute la nuit à 30°C avec agitation. Le lendemain, la culture en plaque est centrifugée 10 min à 2500 rpm et le surnageant contenant les VHH solubles est récolté.

- culture à moyenne échelle

Une colonie de *E. coli* HB2151 (Carter et al., précité) contenant le  
20 plasmide pHEN-VHH est mise en culture dans 75 ml de milieu 2YT additionné d'ampicilline (100  $\mu$ g/ml) et de glucose 1% pendant 2 heures puis la culture est induite par l'IPTG (2mM final) pendant 4 h à 25 °C et centrifugée pendant 10 min à 4000 rpm. Le culot est ensuite remis en suspension dans 1 ml de tampon 200 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 17,2 % sucrose (P/V) puis la suspension est incubée 30  
25 min à 1 h sur de la glace, sous agitation, centrifugée à 13000 rpm; à 4°C, pendant 5 min et le surnageant (périplasme) contenant les VHH solubles est récolté.

**b) Test ELISA (cultures en microplaques)**

Le peptide A $\beta$ 42, dilué dans du tampon PBS (1  $\mu$ g/ml -100  
 $\mu$ l/puits), est distribué dans les puits d'une microplaque et la plaque est incubée une  
30 nuit à 37°C. Des plaques recouvertes de BSA (1  $\mu$ g/ml -100  $\mu$ l/puits) sont utilisées comme contrôle. Après des lavages avec du tampon PBS contenant 0,1 % Tween 20 (PBS-T), 50  $\mu$ l du surnageant de culture II obtenu comme décrit ci-dessus, mélangé à

50 µl de tampon PBS-T contenant 0,5 % gélatine sont ajoutées dans chaque puits et la plaque est incubée pendant 2 heures à 37°C. Après des lavages dans le même tampon que précédemment, l'anticorps murin anti-*c myc* 9E10 (référence sc-40, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) dilué dans du tampon PBS-T (1 µg/ml – 100 µl par puits) est ajouté dans les puits et la plaque est incubée pendant 1 heure à 37°C. Après des lavages dans le même tampon que précédemment, un anticorps anti-immunoglobulines de souris couplé à la peroxydase diluée dans du tampon PBS-T (1 µg/ml – 100 µl par puits) est ajouté dans les puits et la plaque est incubée pendant 1 heure à 37°C. La réaction est révélée par addition d'*O*-phénylènediamine (0,2 % dans du tampon citrate 0.1 M, pH 5.2 contenant 0.03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-100 µl /puits) et incubation des plaques à température ambiante, à l'obscurité. La réaction est ensuite stoppée par addition d'HCl 3 M (50 µl /puits) et l'absorbance à 492 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur automatique. Les valeurs significatives correspondent à un rapport DO (A β42)/DO (BSA) supérieur à 5.

c) Test ELISA en compétition

Des quantités variables du peptide Aβ42 dans du tampon PBS sont incubés avec une concentration fixe de surnageant de culture contenant le VHH, pendant 2 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite transféré dans les puits d'une microplaque recouverte de peptide Aβ42, dans les conditions telles que décrites ci-dessus puis la plaque est incubée pendant 30 min à température ambiante et lavée avec du tampon PBS-T et les VHHs libres (VHHs non liés au peptide Aβ42), présents dans le mélange réactionnel sont dosés en ELISA, selon le protocole tel que décrit ci-dessus. Pour chaque concentration, le pourcentage d'inhibition correspond à la valeur  $\frac{I_0 - I_c}{I_0} \times 100$  où  $I_0$  et  $I_c$  sont les absorbances à 492 nm obtenues respectivement, en l'absence et en présence du peptide Aβ42 dans le milieu réactionnel.

**2) Résultats**

Des VHHs solubles ont été préparés selon le protocole tel que décrit ci-dessus, à partir de 4 clones positifs en ELISA, à savoir :

- VHH ALZ 61 : *E. coli* HB2151 transformée par le plasmide pHEN-1 qui possède la séquence nucléotidique VH-61 (SEQ ID NO: 2) insérée entre

les sites *Sfi I* et *Not I* (pHEN-1/VHH-61), déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2933.

- VHH ALZ L35 : *E. coli* HB2151 transformée par le plasmide pHEN-1 qui possède la séquence nucléotidique VHH-L35 (SEQ ID NO: 4) insérée entre les sites *Sfi I* et *Not I* (pHEN-1/VHH-L35), déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2934.

- VHH ALZ L1-3 : *E. coli* HB2151 transformée par le plasmide pHEN-1 qui possède la séquence nucléotidique VHH-L1-3 (SEQ ID NO: 6) insérée entre les sites *Sfi I* et *Not I* (pHEN-1/VHH-L1-3), déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2935.

- VHH ALZ V31-1 : *E. coli* HB2151 transformée par le plasmide pHEN-1 qui possède la séquence nucléotidique VHH-V31-1 (SEQ ID NO: 8) insérée entre les sites *Sfi I* et *Not I* (pHEN-1/VHH-V31-1), déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2936.

La séquence en acides aminés des VHH de ces clones (SEQ ID NO: 3, 5, 7 et 9) est illustrée par la figure 3.

La spécificité et l'affinité du VHH produit par ces clones pour le peptide A $\beta$ 42 ont été analysées, respectivement en ELISA direct et par un test ELISA en compétition. Les résultats sont les suivants :

- les clones produisent un VHH qui se lie spécifiquement au peptide A $\beta$ 42 (figure 4), et

- les clones produisent un VHH qui présentent une affinité élevée pour le peptide A $\beta$ 2 : une inhibition de respectivement 56 % et 42 % pour le VHH-L35 et VHH-L1-3 est observée pour une concentration de  $3 \cdot 10^{-8}$ M de peptide A $\beta$ 42.

De manière plus précise, l'affinité des VHH L35 et L1-3 sont respectivement de  $3 \cdot 10^{-8}$ M et  $6 \cdot 10^{-8}$ M.

Des études complémentaires mettant en œuvre des peptides chevauchant correspondant à des fragments du peptide A $\beta$ 42 ont montré que le VHH V31-1

réagit avec la partie carboxy terminale avec une affinité d'environ  $10^{-8}$ M et reconnaît bien par ELISA la forme fibrillaire de A $\beta$ 42, mais pas la forme A $\beta$ 40. En immunohistochimie, sur des coupes de cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer, un marquage intraneuronal sous forme de dépôts granulaires est observé avec le VHH V31.

**Exemple 4 : Production de VHH solubles et analyse de la spécificité et de l'affinité des VHH solubles pour les bactéries exprimant à leur surface de la phosphorylcholine**

1) Immunisation d'alpagas avec du *Streptococcus pneumoniae* dénaturé par la chaleur ou avec de la phosphorylcholine couplée à de l'albumine d'alpaga (ASA-PC).

Deux alpagas ont été immunisés respectivement avec deux antigènes, naturel (*S. pneumoniae* dénaturés par la chaleur) ou synthétique pour obtenir des anticorps monoclonaux anti-PC. Un mime de l'antigène de *S. pneumoniae* comprenant à la fois la PC et une partie de son support naturel a été synthétisé, c'est-à-dire la N-Acetyl-D-galactosamine liée en position 6 (6-O-PC- $\beta$ -D-GalNAc). Ce synthon a été couplé à de l'albumine d'alpaga. Après 5 immunisations, le sérum des alpagas contient des anticorps anti-PC. La spécificité des sérums pour la phosphorylcholine a été caractérisée en mesurant la concentration inhibitrice 50 % (IC50) des sérums vis-à-vis du polysaccharide C, qui correspond à de la PC couplée à des acides teichoïques. Les IC50 sont respectivement de 5 ng/ml pour l'alpaga immunisé avec le composé synthétique et de 0,5 ng/ml pour l'alpaga immunisé avec les *S. pneumoniae* dénaturés par la chaleur.

Le protocole utilisé est du même type que celui décrit à l'exemple 1. Pour ce qui concerne plus précisément l'obtention de l'antigène à base de *S. pneumoniae*,  $1,5 \cdot 10^8$  bactéries/ml sont chauffées toute une nuit à 37°C.

2) Purification des ARNm et synthèse des ADNc

Les lymphocytes sanguins sont préparés, à partir du sang hépariné prélevé à J<sub>131</sub>, par centrifugation en gradient de Ficoll, sensiblement dans les mêmes conditions que celles exposées à l'exemple 1. De manière plus précise, 300 ml de sang d'alpagas immunisés dans les conditions précisées ci-dessus, à savoir l'un avec ASA-PC (PC couplée à de l'albumine d'alpaga) et l'autre avec du *Streptococcus pneumoniae*, dénaturé par la chaleur est collecté, en présence de 5ml d'anticoagulant

(Héparine). Ce sang est ensuite dilué au 1/2 dans du HBSS, puis réparti dans des tubes (environ 25 ml par tube) et avec de l'Histopaque (environ 15 ml par tube) (Histopaque 1077, Sigma) pour créer un gradient de densité. Les échantillons sont centrifugés 30 minutes à 400 g. Les cellules mononucléées qui forment un anneau à l'interface plasma-Histopaque sont récupérées et lavées 3 fois dans du HBSS.

Les lymphocytes ainsi obtenus ( $10^8$  cellules) sont aliquotés puis les ARN sont isolés à partir de  $10^7$  cellules. Le culot de cellules est repris dans 500 µl de RNAXEL (Eurobio) et 100 µl de chloroforme. 0,4 g de billes (212-300 microns) sont ensuite ajoutés pour permettre le broyage des cellules par l'appareil FastPrep (Q.BIOgene, Illkirch, France) pendant 2 fois 30 secondes à vitesse maximale. La phase supérieure est récupérée puis traitée au TRIzol (Invitrogen, San Diego, CA). Après lavage au chloroforme, précipitation à l'isopropanol et lavage à l'éthanol, le culot est repris dans 100 µl d'eau traitée au DEPC (0,01 %) puis précipité par du chlorure de lithium de concentration finale 2 molaire. Cette ultime étape assure la pureté de l'échantillon d'ARN. Les aliquotes sont ensuite conservés à - 80°C.

L'ADNc est synthétisé à partir de 1,5 µg d'ARN dans les conditions suivantes : 2 µl de β-mercaptoéthanol (1M) et 2 µl de RNAsine 40 U/µl (PROMEGA) sont ajoutés à 20 µl de la préparation d'ARNm purifié et le mélange est incubé 5 min à température ambiante, puis 2 heures à 42 °C, dans un volume de 96 µl contenant 400 UI de de reverse transcriptase MLV superscript II (Invitrogen, San Diego, CA) dans du tampon MLV(GIBCO), 8,33 mM DTT, 500 µM de chacun des dNTPs et 6 à 30 pmoles d'amorce hexanucléotidique aléatoire (PdN6). On obtient alors les ADN complémentaires (ADNc) de ces ARN.

L'ADN ainsi synthétisé sert de matrice pour des réactions de PCR pour l'amplification des gènes codant pour  $V_H-C_H2$ . Selon qu'il s'agit d'un anticorps conventionnel ou d'un anticorps à domaine variable unique, l'amplifiat a un poids moléculaire différent. En effet, la présence de la région  $C_H1$  et la longueur de la région charnière déterminent la taille de l'ADN amplifié. Ainsi, l'amplifiat correspondant à un anticorps conventionnel (IgG1) est de l'ordre de 900 pb, celui correspondant à une IgG de type 2 (anticorps à domaine unique) est d'environ 690 pb, et celui correspondant à une IgG 3 (anticorps à domaine unique) est de 620 pb.

On peut ainsi discriminer les deux catégories d'anticorps et réamplifier les fragments d'environ 650 pb, contenant le V<sub>H</sub>H, par une seconde PCR. On obtient alors des fragments d'environ 400 pb correspondant au V<sub>H</sub>H. Lors de cette seconde PCR, des amorces spécifiques présentant chacune un site de clivage pour une enzyme de restriction à site rare sont utilisées.

De manière plus précise, les fragments obtenus sont amplifiés par des réactions de PCR imbriquées (*nested PCR*) :

- 1<sup>ère</sup> réaction PCR

L'ADNc précédemment synthétisé (produit de 650 pb) correspondant au fragment VHH-charnière CH2 est amplifié à l'aide du couple d'amorces :  
- VHBAC A6 (5' GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGRGGAGG 3') (SEQ ID NO :10) et  
- CH2FORT A4 (5' CGCCATCAAGGTACCAGTTGA 3') (SEQ OD NO :11).

Le mélange de PCR est composé de 5 µl d'ADNc, 30 pmol de chaque amorce, 1 µl d'un mélange équimolaire de dNTP 25 mM, 3 µL de MgCl<sub>2</sub>, 5 µL de tampon de PCR 10X et de 5 unités de Hot Start Taq polymérase qui permet une dénaturation de l'ADN à température élevée (94°C pendant 15 minutes). La PCR se poursuit ensuite par 40 cycles successifs d'hybridation (30 secondes à 52°C), d'extension d'amorce (30 secondes à 72°C) et de dénaturation (30 secondes à 94°C). La réaction se termine par une phase d'élongation terminale de 10 minutes à 72°.

Le produit d'amplification de 650 pb est séparé par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium, dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA), extrait du gel et purifié à l'aide du kit Nucleospin Extract (MACHEREY/NAGEL).

25                    2<sup>ème</sup> réaction PCR

Un produit d'environ 400 pb correspondant au fragment VHH est amplifié à partir du produit de 650 pb, à l'aide des amorces suivantes :

- VHBAC A4 (*Sfi*I): 5' CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAKGTSCA GCT 3' (SEQ ID NO: 12)

30 et

- VHFOR36 (*Not*I): 5' GGACTAGTTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCTG 3' (SEQ ID NO: 13),

qui contiennent respectivement les sites de restriction des enzymes SfiI et NotI.

A la différence de la première PCR, il n'y a que 35 cycles d'amplification et la phase d'extension d'amorce dure une minute.

5 Le produit d'amplification de 400 pb est séparé par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium, dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA), extrait du gel et purifié à l'aide du kit Nucleospin Extract (MACHEREY/NAGEL), puis quantifié.

3) Clonage des ADNc dans le vecteur pHEN2 (préparation des banques)

10 Le vecteur utilisé pour le clonage de V<sub>H</sub>H est le plasmide pHEN 2 (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk>). Il est de nature phagemidique, c'est-à-dire qu'il contient deux origines de répllication : d'une part celle du phage M13 (parasite naturel d' *E. coli*) qui permet la synthèse de particules phagemidiques dont l'ADN est simple brin, et d'autre part celle du plasmide Col E1 (Bedbrook, JR. et al., Nature, 1979, 281, 15 447) qui permet la répllication d'ADN double brin.

Lors du clonage, le gène codant pour V<sub>H</sub>H est inséré en phase avec le gène g III codant pour la région C-terminale, allant des acides aminés 198 à 406, de la protéine membranaire p III. Cette protéine de fusion V<sub>H</sub>H-pIII est sous la dépendance du promoteur lac inductible par l'IPTG, et est située à l'extrémité du phage. 20 L'induction par IPTG de cellules infectées par le phagemide permet la synthèse de la protéine de fusion V<sub>H</sub>H-pIII puis son exportation au niveau du périplasme. Ceci se fait sous la conduite de séquences leader Pel B, secondairement clivée par une protéase de la cellule hôte.

Après ligation des inserts dans les vecteurs, des transformations par 25 choc thermique sont effectuées. Après optimisation du ratio VHH/pHEN2, la taille des deux banques est d'environ  $2.10^5$  CFU (Colony Forming Unit) pour chacune.

De manière plus précise, à partir de 11 µg de plasmide dans 23 µl d'eau, on effectue une coupure Sfi I (New England BioLabs, ) du côté 5' de l'ADN. Pour cela, on ajoute 30 unités d'enzyme, 3,5 µl de son tampon (NEB2) et 4 µl de BSA 30 pour optimiser la réaction. De même, on prépare les inserts à partir de 1 µg de chaque ADN.



La digestion a lieu durant une nuit à 50°C ; puis on ajoute 2 µl de NaCl, 0,7 µl de tampon et 30 unités de NotI (Roche) pour effectuer la digestion du côté 3' pendant 5 heures à 37°C.

Les ADN (inserts et vecteurs) sont ensuite purifiés sur gel et quantifiés, dans les mêmes conditions que celles exposées ci-dessus.

Afin d'éviter une autoligation du vecteur lors de l'étape suivante, on effectue une déphosphorylation de celui-ci. A partir de 5 µg de pHEN2 purifié, on ajoute 25 µl d'eau, 5 µl de tampon 10X et 1 µl de phosphatase alcaline de veau (CIP). Après 30 minutes d'incubation à 20°C, la réaction est arrêtée avec de l'EDTA de concentration finale 20 mM puis l'échantillon est incubé 20 minutes à 75°C.

On réalise deux extractions phénol-chloroforme pour purifier le vecteur. L'ADN est ensuite précipité dans 0,1 volume d'acétate de sodium 3M (pH=5) et 3 volumes d'éthanol 100% pendant une nuit, puis est repris dans 50 µl d'eau.

Le plasmide pHEN2 linéarisé et déphosphorylé et le produit d'amplification de 400 pb préalablement digéré par les enzymes Sfi I et Not I, sont ensuite incubés en présence de ligase (T4 DNA LIGASE, NEW ENGLAND BIOLABS).

Puis, 5 µl de chaque ligation sont mis en présence de 50 µl de bactéries compétentes (XL2-Blue MRF' Ultracompetent Cells, Stratagene). Les tubes sont incubés une demi-heure dans la glace, puis 30 secondes à 42°C. Après ce choc thermique, on ajoute 900 µl de solution SOC (20 g de bacto-tryptone, 5 g de bacto-yeast extract, 0,5 g NaCl qsp 1 l d'eau plus 20 mM de glucose) pour permettre aux bactéries de récupérer et croître pendant 1h à 37°C. 100 µl de chaque test sont étalés sur boîte de Pétri, en milieu 2YTAG (Yeast Tryptone Ampicilline Glucose).

Le phagemide contient un gène de résistance à l'ampicilline qui permet la sélection positive des cellules transfectées, lors de la croissance sur milieu antibiotique. Les colonies obtenues sont ensuite comptées. La ligation correspondant au meilleur ratio (ratio insert:vecteur 2:1) est de nouveau effectuée, en grande quantité. Puis on réalise des électroporations en masse. Pour chacun des deux alpagas, il est nécessaire de préparer 8 tubes de 15 ml avec 1 ml de milieu SOC. Sur glace, dans 8 tubes Eppendorf froids, 40 µl de bactéries (SURE Electroporation-Competent Cells, Stratagene) sont mis au contact de 4 µl de vecteur d'expression dans chacun des

8 tubes. Après 5 minutes, les 44 µl de culture sont déposés dans une cuve d'électroporation refroidie à 4°C. L'appareil (Bio-Rad) est alors réglé sur un voltage de 2,5 kV, une capacitance de 25 µF et une résistance de 200 Ω. Immédiatement après électroporation, le milieu SOC est aspiré avec une pipette Pasteur de façon à le rajouter aux bactéries et les transférer au plus vite dans le Falcon ensuite placé à 37°C sous agitation pendant une heure. 10 et 100 µl de cette préculture sont ensuite étalés sur boîte de Pétri 2 YTAG et le reste des 8 tubes est étalé sur plaque "screening" 500 cm<sup>2</sup> (Fisher Scientific Labosi, Elancourt, France). Toutes les boîtes sont placées à 37°C pendant une nuit. Les colonies résistantes sont remises en suspension dans du milieu YT2 et la banque est conservée à -80°C dans du glycérol.

#### 4) Contrôle de la diversité de la banque

10 colonies résistantes de chaque alpaga sont de nouveau mises en culture dans 5 ml de milieu 2YTAG. A partir de 4 ml de celles-ci, l'ADN plasmidique est extrait à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne).

La présence d'un insert est contrôlée par restriction enzymatique de l'ADN plasmidique à l'aide des enzymes de restriction *Sfi* I et *Not* I (BIOLABS) en suivant les instructions du fabricant, puis déposé sur gel d'agarose 1% pour vérifier la présence de l'insert.

La diversité de la banque est contrôlée par amplification de l'ADN plasmidique, par PCR, à l'aide du couple d'amorces M 13-40 (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3', SEQ ID NO :50) et Myc Seq 10 (5'-CTCTTCTGAGATGAGTTTTTG-3', SEQ ID NO :51). L'amplification se fait lors de 30 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 54°C, et 30 secondes à 72°C précédés par 5 minutes à 94°C et suivis par 10 minutes à 72°C. Les produits de PCR sont déposés sur gel d'agarose 1% pour vérifier la présence de l'amplifiat. Puis ils sont envoyés à la société Génome Express S.A. (Grenoble, France) avec les amorces utilisées, pour être séquencés. Les séquences sont ensuite analysées grâce au logiciel DNA Strider 1.3f11, puis alignées par le logiciel CLUSTAL W.

5) Criblage de la banque de VHH anti-phosphorylcholine par la technique d'exposition des phages (sélection des phages VHH spécifiques de la phosphorylcholine)

a) Préparation des phages

5 50 µl de banque de chaque alpa sont dilués dans 1 ml de milieu 2 YTAG. Les bactéries sont mises sous agitation à 37°C pendant 3 heures puis sont utilisées pour ensemencer 100 ml de 2 YTAG jusqu'à obtention d'une DO de 0,044 à 600 nm ; soit environ 250 µl de la préculture. La culture est également mise sous agitation à 37°C jusqu'à obtention d'une DO à 600 nm de l'ordre de 0,5 ; c'est-à-dire en  
10 début de phase exponentielle de croissance des bactéries.  $5 \cdot 10^{11}$  PFU de phage Helper M13K07 (Viera J et al., Methods Enzymol., 1987, 153, 3-11) résistant à la kanamycine sont ajoutés à la culture qui est ensuite incubée 30 minutes à 37°C sans agitation puis 30 minutes à 37°C avec agitation.

Après centrifugation pendant 15 minutes à 4°C et 4 000 g, le  
15 surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 300 ml de 2YTAG contenant de la Kanamycine à 50 µg/ml. La culture est incubée durant une nuit à 30°C sous agitation.

Les phages en suspension sont centrifugés deux fois pour éliminer les bactéries (10 minutes, 8 000 rpm, 4°C, puis précipités pendant 4 heures à 4°C en présence de 0,04 volume de PEG-NaCl. Le précipitat est centrifugé une demi-heure à  
20 8 000 rpm et 4°C, puis repris dans 1 ml de PBS stérile.

b) Titrage des phages

La souche *d'E. coli* utilisée pour le titrage est TG1 (Stratagène, La Jolla, CA), dans laquelle le pili sexuel est codé par un transposon. Une colonie de TG1 sur milieu minimum, est repiquée dans 2 ml de 2YT. Cette préculture est incubée  
25 durant une nuit à 37°C puis sert à l'ensemencement de 50 ml de 2 YT jusqu'à obtention d'une DO de 0,045. La culture est mise sous agitation à 37°C jusqu'à ce que la DO atteigne 0,5 à 600 nm, c'est à dire environ 2 heures.

5 aliquotes de 50 µl de TG1 sont ensuite additionnés de 1 µl de phage précédemment préparé, à différentes dilutions ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ). Après  
30 15 minutes à température ambiante, les aliquotes sont étalées sur boîte de Pétri 2 YTAG et incubées une nuit à 37°C. Le titrage est enfin effectué lorsque les colonies sélectionnées sont comptées.

## c) Criblage

Le criblage s'effectue à partir de  $2,5 \cdot 10^{11}$  phages/ml dans 100  $\mu$ l de PBS, auxquels est ajouté 1  $\mu$ l de GPB (Gal-Nac-PC-Biotine) à 1mg/ml (Figure 5). Le mélange est incubé 2 heures à température ambiante sous agitation, puis additionné de 900  $\mu$ l de PBS et 100  $\mu$ l de gélatine à 0,5%. Les phages ayant une affinité pour la PC sont alors liés à GPB. Après 10 minutes d'agitation, le mélange est transféré dans un immunotube préalablement coâté par de la neutravidine. Celle-ci ayant une affinité très élevée pour la biotine (de l'ordre de  $10^{13}$ ), les phages liés à GPB se lient aux parois des immunotubes placés une heure sous agitation à température ambiante. Les tubes sont ensuite lavés 10 fois par du PBS-tween 0,1%, puis 10 fois en PBS. On ajoute alors 1 ml de DTT 50 mM dans les tubes que l'on agite durant une demi-heure, pour casser la liaison dissulfure PC-Biotine. 500  $\mu$ l sont conservés à 4°C et 500  $\mu$ l sont incubés avec 5,5 ml de TG1 en phase exponentielle dans un tube de 15 ml, pendant 45 minutes, à 37°C. En parallèle, les immunotubes sont remplis par 4 ml de TG1. Les deux tubes sont alors réunis puis centrifugés 10 minutes, à 4°C et 4 500 rpm. Le culot est repris dans 2 mL de 2 YT puis étalé sur boîtes 2 YTAG. 100  $\mu$ l aux dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  sont étalés sur boîtes de Pétri et le reste sur grande boîte de "screening". Après culture durant la nuit à 37°C, les colonies des boîtes de Pétri sont comptées pour estimer la proportion de phages sélectionnés par leur affinité pour la PC. Les grandes boîtes sont raclées en présence de 2 ml de 2 YT puis les bactéries sont conservées dans 2 ml de glycérol 40%, à - 20°C. Auparavant, 10  $\mu$ l de bactéries servent à ensemencer 50 ml de 2 YTAG pour préparer de nouveaux phages selon le même protocole que précédemment. Une fois le PEG-NaCl bien éliminé, le culot est repris dans 500  $\mu$ l de PBS. Les phages sont de nouveau titrés puis conservés à 4°C.

Afin de ne pas sélectionner les phages ayant une affinité pour l'agent saturant, celui-ci est changé à chaque tour de criblage. Ainsi, lors du premier tour l'agent saturant des immunotubes est la gélatine à 0,5% ; au second tour, du lait 2% dialysé est utilisé et au troisième tour on utilise de nouveau de la gélatine.

## d) Résultats

Les bactéries sont infectées par un phage helper (M13K07), comme précisé ci-dessus, qui permet la réplication d'ADN sous forme simple-brin. La

majorité des virions produits présente alors la protéine de fusion VHH-pIII exprimée à la surface, ce qui permet la sélection des virions les plus avides vis-à-vis du polysaccharide C. A l'issue du 1<sup>er</sup> tour de criblage,  $2.10^6$  phages (output) sont susceptibles de reconnaître le polysaccharide C parmi les  $2,5.10^{11}$  initialement présents (input), ce qui correspond à la fixation d'un phage sur 105. Après le second tour de criblage, 1% des phages sélectionnés précédemment est conservé. Le 3<sup>ème</sup> tour de criblage est effectué 2 fois, et les résultats sont similaires. En effet, le rendement de fixation est à chaque fois de  $10^{-4}$ . Cette dernière baisse de rendement pourrait être due à des conditions plus drastiques (augmentation de la stringence et diminution de la concentration de GPB).

Tableau V : Criblage de la banque de VHH obtenue à partir de l'alpaga immunisé par *S. pneumoniae*

	Conditions	Input	output	$\rho = \text{input/output}$
Criblage 1	0,1% Tween GPB $10^{-6}$ M	$2,5.10^{11}$ $\phi$ /ml	$2.10^6$ $\phi$ /ml	$10^{-5}$
Criblage 2	0,3% Tween GPB $10^{-7}$ M	$10^{12}$ $\phi$ /ml	$3.10^{10}$ $\phi$ /ml	$10^{-2}$
Criblage 3	0,5% Tween GPB $10^{-8}$ M	$10^{11}$ $\phi$ /ml	$10^7$ $\phi$ /ml	$10^{-4}$
Criblage 3bis	0,5% Tween GPB $10^{-8}$ M	$4.10^{11}$ $\phi$ /ml	$4.10^7$ $\phi$ /ml	$10^{-4}$

#### Exemple 5 : Sélection de phages-VHH spécifiques de la phosphorylcholine

Après le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> tour de criblage, des phages pris au hasard sont testés par ELISA direct pour leur affinité pour le polysaccharide C. Au total 11 phagemides sont sélectionnés et les séquences sont données dans la figure 6. Ces anticorps sont exprimés sous forme soluble en dehors du contexte du phage.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

### REVENDICATIONS

1°) Utilisation d'anticorps à chaîne unique de camélidés, sélectionnés dans le groupe constitué par des anticorps comprenant des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes ne  
5 secrétant pas de toxine ou ne contenant pas la protéase NS3 de l'HCV et des anticorps comprenant des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, pour la détection de la présence d'un agent pathogène ne secrétant pas de toxine ou ne contenant pas la protéase NS3 de l'HCV ou pour la détection d'une maladie comprenant des dépôts de substances amyloïdes insolubles.

10 2°) Banque immune d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2937.

15 3°) Fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigé contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, caractérisé en ce qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture de la banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps selon la revendication 2, dans des conditions permettant l'expression desdits fragments variables,
- 20 - la mise en contact desdits fragments variables avec le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, dans des conditions permettant la liaison dudit fragment variable d'anticorps avec ledit peptide, et
- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables d'anticorps capables de se lier audit peptide.

25 4°) Fragment variable d'anticorps selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il présente une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 3, 5, 7 et 9.

30 5°) Anticorps ou fragment d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable selon la revendication 3 ou la revendication 4.

6°) Molécule d'ADNc, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé tel que défini à la revendication 3.

7°) Molécule d'ADNc selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 2, 4, 6 et 8.

8°) Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend au moins  
5 une molécule d'ADNc selon la revendication 6 ou la revendication 7.

9°) Cellule hôte procaryote ou eucaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 6 ou la revendication 7 ou un vecteur recombinant selon la revendication 8.

10°) Cellule hôte procaryote selon la revendication 9, déposée à la  
10 Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2933.

11°) Cellule hôte procaryote selon la revendication 9, déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2934.

12°) Cellule hôte procaryote selon la revendication 9, déposée à la  
15 Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2935.

13°) Cellule hôte procaryote selon la revendication 9, déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur  
20 Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2936.

14°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps selon la revendication 3 ou la revendication 4 ou bien d'un anticorps ou un fragment d'anticorps selon la revendication 5 pour la préparation d'un réactif de diagnostic destiné à la détection de maladies dans lesquelles on observe un dépôt de substances amyloïdes insolubles,  
25 dans un ou plusieurs organes ou tissus et notamment de maladies neuroagréatives.

15°) Kit de diagnostic de maladies comprenant des dépôts de substances amyloïdes insolubles, dans un ou plusieurs organes ou tissus et notamment de maladies neuroagréatives, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable d'anticorps selon la revendication 3 ou la revendication 4 ou bien un anticorps  
30 ou un fragment d'anticorps selon la revendication 5.

16°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment variable d'anticorps selon la revendication 3 ou la

revendication 4 ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps selon la revendication 5, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

17°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps selon la revendication 3 ou la revendication 4 ou bien d'un anticorps ou un fragment d'anticorps selon 5 la revendication 5 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies comprenant le dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes.

18°) Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que lesdites maladies sont des maladies neuroagréatives, notamment la maladie 10 d'Alzheimer.

19°) Fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigé contre des agents pathogènes ne sécrétant pas de toxines, caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître les agents pathogènes ou des fragments de ceux-ci à l'intérieur ou à l'extérieur de cellules eucaryotes ou de tissus ou d'organes de 15 mammifères et en ce qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture d'une banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes, exprimant à leurs surfaces des molécules d'adhésion de la paroi bactérienne, dans des conditions 20 permettant l'expression desdits fragments variables,

- la mise en contact desdits fragments variables d'anticorps avec au moins une molécule d'adhésion ou des agents pathogènes exprimant à leur surface des molécules d'adhésion, dans des conditions permettant la liaison desdits fragments variables d'anticorps avec au moins une desdites molécules d'adhésion, et

- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables d'anticorps VHH-anti-molécule d'adhésion capables de se lier à la molécule d'adhésion correspondante. 25

20°) Fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique selon la revendication 19, caractérisé en ce que ladite molécule d'adhésion est la 30 phosphorylcholine, en ce que ledit fragment variable d'anticorps est capable de reconnaître les agents pathogènes ou des fragments de ceux-ci à l'intérieur ou à l'extérieur de cellules eucaryotes ou de tissus ou d'organes de mammifères et en ce



qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture d'une banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes, exprimant à leurs surfaces de la phosphorylcholine (VHH-anti-phosphorylcholine), dans des conditions  
5 permettant l'expression desdits fragments variables,

- la mise en contact desdits fragments variables d'anticorps avec de la phosphorylcholine ou des agents pathogènes exprimant à leur surface de la phosphorylcholine, dans des conditions permettant la liaison desdits fragments  
10 variables d'anticorps avec la phosphorylcholine, et

- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine capables de se lier à la phosphorylcholine.

21°) Fragment variable d'anticorps selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il présente une séquence en acides aminés sélectionnée dans le  
15 groupe constitué par les séquences SEQ ID NO :29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 et 49.

22°) Anticorps ou fragment d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable selon l'une quelconque des revendications  
19 à 21.

20 23°) Molécule d'ADNc, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé tel que défini à la revendication 19 ou la revendication 20.

24°) Molécule d'ADNc selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'elle présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 et 48.

25 25°) Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins une molécule d'ADNc selon la revendication 23 ou la revendication 24.

26°) Cellule hôte eucaryote ou procaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 23 ou la revendication 24 ou un vecteur selon la revendication 25.

30 27°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la paroi bactérienne, pour la préparation d'un

réactif de diagnostic destiné à la détection des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment au moins une molécule d'adhésion à leur surface.

28°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine selon la revendication 20 ou bien d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps dérivés, selon la revendication 22 pour la préparation d'un réactif de diagnostic destiné à la détection des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment la molécule d'adhésion phosphorylcholine à leur surface et notamment les maladies infectieuses des voies respiratoires.

29°) Kit de diagnostic des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment de la phosphorylcholine à leur surface, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine selon la revendication 20 ou la revendication 21 ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant ledit fragment variable d'anticorps selon la revendication 22.

30°) Composition pharmaceutique comprenant des anticorps de camélidés dirigés contre des agents pathogènes ou leurs fragments, caractérisée en ce qu'ils ne secrètent pas de toxine et qu'ils ne sont pas des éléments constitutifs de la protéase NS3 de HCV.

31°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la paroi bactérienne selon la revendication 19.

32°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine selon la revendication 20 ou la revendication 21 ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant ledit fragment variable d'anticorps selon la revendication 22, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

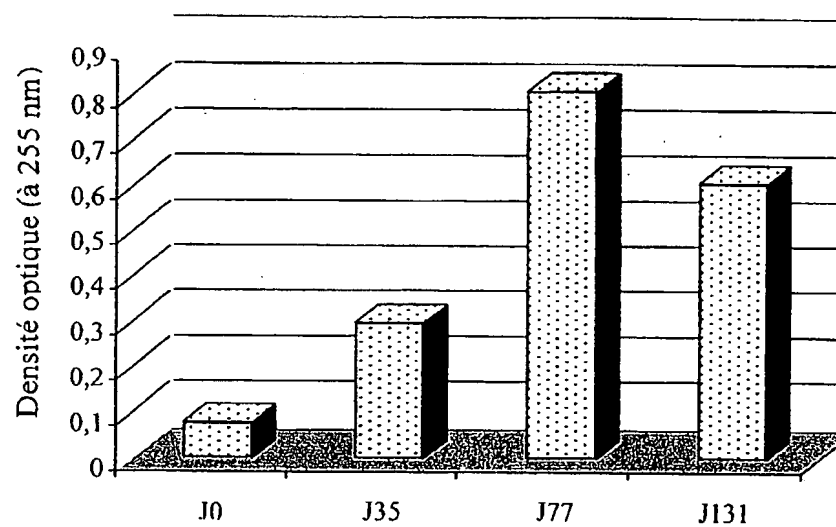
33°) Composition pharmaceutique selon la revendication 32, caractérisée en ce que lesdits véhicules pharmaceutiquement acceptables sont appropriés à une administration intranasale.

34°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la paroi bactérienne, pour la préparation d'un

médicament destiné au traitement des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment au moins une molécule d'adhésion à leur surface.

35°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine selon la revendication 20 ou la revendication 21 ou bien d'un anticorps ou un fragment d'anticorps selon la revendication 22, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment de la phosphorylcholine à leur surface.

36°) Utilisation selon la revendication 35, caractérisée en ce que lesdites maladies sont des maladies infectieuses qui colonisent les muqueuses, et plus particulièrement des maladies infectieuses des voies respiratoires.

**Figure 1**

CDR 1

VHH-03	ADVQLQASGGG	L	VQPGGSLSCAASGGFTFR	TSDMS	W	V	RQAPGK	GL	E	W	YS	YDSGSGRKLAYADSAKG	RFITISRDNAKNTVYLOMNSLKPEDTG
VHH-05	ADVQLQASGGG	L	VQPGESLTLSCRAYGFTLD	YCAVG	W	F	RQAPGK	ER	E	G	VA	CIGSSLGRTDYADSVKGG	RFITISRDNAKNTMYLOMNDLKPEDIAA
VHH-07	GRCQLQASGGG	L	VQPGGSLRLSCAASGFTLE	YYALA	W	F	RQAPGK	ER	V	G	IS	CISSTNGCRADYVDSVKG	RFITISRDNAKNAFYLOMNSLKPEDITA
VHH-25	GRGPLQASGGG	L	VQPGGSLTLSCIASGFTLD	YYSVG	W	F	RQAPGK	KR	E	R	VS	CTGPNGESTNYADSVKGG	RFITISRDNAKNTAYLOMNSLKPDDTA
VHH-11	VQLQASGGG	L	VQAGGSLNLSCAASGRSFS	GYALG	W	F	RQAPGK	ER	E	F	VG	AISWIGIGRTYYAVSVKGG	RFITITRDNAKNTLNLQMNSLKPEDITA
VHH-33	ADVQLQASGGG	L	AQAGGSLRLSCAASGGTDS	INVMA	W	Y	RPAPGK	QR	E	L	VA	AIAR-DARTNYADSLKG	RFITVTRDNAKNTVYLOQNRMKPEDITA

CDR 3

VHH-03	VYVC	KIGGAMCVPEYDY----	WGQCTQTVTSSEPKTPKP	cIgg1	(SEQ ID NO: 26)
VHH-05	VYYCAA	AMWCKQLMMSSNYTKI	WGQCTQTVTS	cI9G3	(SEQ ID NO: 24)
VHH-07	VYYCAA	VALPQCTWARMEYDYS-	WGQCTQTVTS	cI9G2	(SEQ ID NO: 22)
VHH-25	VYYCAA	KGSDGDYFSIQKIDS---	-GGCTQTVTS	cI9G2	(SEQ ID NO: 23)
VHH-11	VYYCAA	EALMHTQTPRHY-----	WGQCTQTVTSSEPKTPKP	cI9G3	(SEQ ID NO: 25)
VHH-33	VYYCNA	EALMHTQTPRHY-----	WGQCTQTVTSSEPKTPKP	cI9G3	(SEQ ID NO: 27)

Mutations des acides aminés des FR1 et FR2 entre VH et VHH

	W47	L45	G47	R47
VH	L11	V37	G44	L45
VHH	S11	F37	E44	R45
		Y37	Q44	

## Figure 2

3/8

```

61      AEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGS-TFRI NRMG WYRQAPGKQRELVA
L35     AEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGS-TFSI NVIG WYRQAPGKQRELVA
L1-3    AEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCSASASTTFSM NTMA WHRQAPGKQRSIVA
V31-1   AEVQLQASGGGSVQPGGSLRLSCAASGF-IFGW STMS WVRQAPGKGLEWVS
          ***** ** .*****:***. * . :. * ***** . *:

61      SINSGG-STNYADSVKG RFTISRDNAGTVNLTMNSLKPEDTAVYYC
L35     GISRSG-NTNYADSVKG RFTISRDIYAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC
L1-3    LIGATH-SINYEDSVKG RFTISRDNAGTVYLQMSSSLKPEDTAVYYC
V31-1   TISGGGSATTYTDSVKG RFTISRDRAKNTLYLQMNSLKPEDTAIYYC
          *.      . * ***:*** ***** **.*: * *.*****:***:

61      NR----VTPWP---Y WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 3)
L35     HS----KTYLLHM-Y WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 5)
L1-3    ND----WYWQMKGGS WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 7)
V31-1   NADVSTGFRYQRKDY WGRGTQVTVSSEPKTPKPQP (SEQ ID NO: 9)
          **:*****

```

Figure 3

4/8

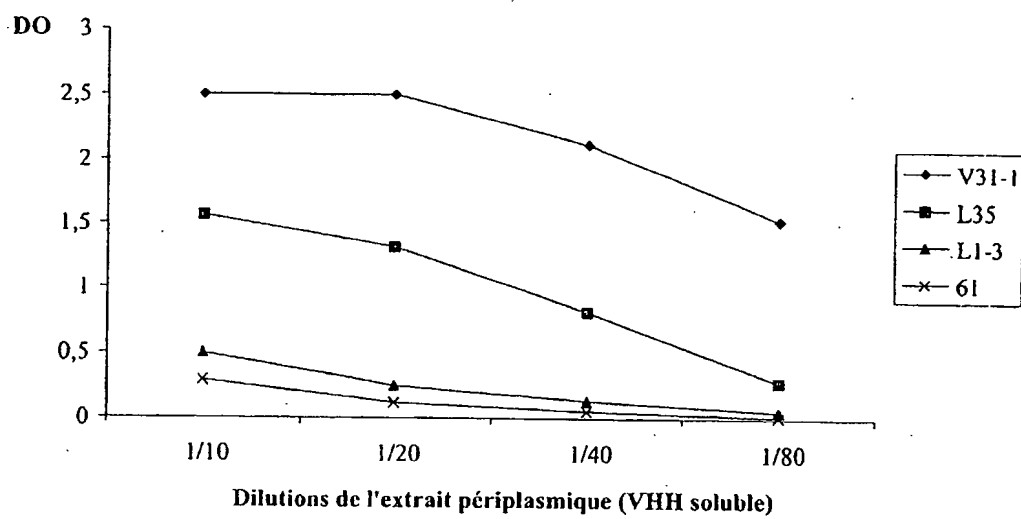


Figure 4

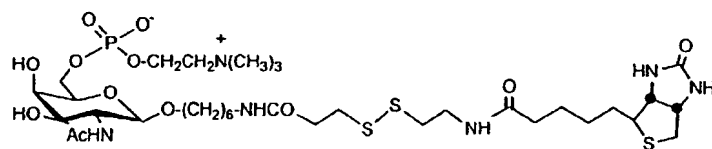


FIGURE 5



6/8

## Clone 1

GAGGTGCAGCTGcAGGCGTCTGGGGGGGCTTGGTGGAACCTGGGGGGTc  
TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGAAAGCATCTGGGTCAATGTAATGG  
ACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGGAGTTGGTCGCAGCTATT  
ACTCGTGGTGGTGTCAAACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTAC  
CATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACATGATGTTCTTGCAAATGCACAGCC  
TGCTACCTGAGGACACGGCCGTCTATTATTGCCATGCGCGTACATGGaga  
GACTATTGGGGCCAGGGGACcCaggtCACGTCTCCTCCAGCGGCCGCACA  
TCATCATCACCATCACGGGGCCGCAGAACAAAA

## Clone 2

GAGGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAGCCTGGGGGGTc  
TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGCAAGCATCTTCAGTATCGATGGCA  
TGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGAAAGCAGCGGAGTTGGTCGCAGGT  
ATTACTAGTGGTGGTAGCACAACCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT  
CACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACATGATGTTCTTGCAAATGCGCA  
GCCTGTACCTGAGAACACGGCCGTCTATTACTGTCATGCGCGTACATGG  
AGAGACTATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAGCGGCCGC  
ACATCATC

## Clone 3

GAGGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGATTGGTGAGACCGGGGGCTc  
TCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGACGCACCTTCAGCAGCTACGCCA  
TGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGAGAGTTGTAGCAGCT  
GTTAGCCAGAGTGGTGTTCTGTACAACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG  
ATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGTTACCGGTGTATCTGCAAACGA  
ACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCCTTTATTACTGTGCAGCCACTACG  
AAACCCTTTTTGGGGGTACGAATGTTTCAACCAGAGTACTGGGGCCAGGG

## Clone 4

GATGTCCAGCTGCAGGCGTCTGGAGGAGGCTTGGTGAGCCTGGGGGGTc  
TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTAACCATGCCA  
TGGGCTGGTACCGCCAGCCTCCAGGGAAGCAGCGGAGTTCTGCGCAAAT  
ATTTTtagTGGCGGTGCGATAAACTATGCAGACTTCGTGAAGGGCCGATT  
CACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATACGGTGTATCTGCAAATGAACA  
AACTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATCCCTGTAATGCGTGGAGGTTA  
GGTTATGACTATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCAGCGGC  
CGCACATCATC

FIGURE 6.1

7/8

## Clone 5

GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTC  
TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCGTCTTCAGAGTCAGTACCA  
TGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCAGTTGGTCGCAACT  
ATTTCTAGTGGTGGTAGTACAACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT  
CACCATCTACAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACA  
GCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCAAATACAGGA  
CTCCGTACCCCTTTCGTTCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC  
AGCGGCC

## Clone 7

GAGGTgCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGGCTC  
TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGAACGCACCTTCAGTAACGCTCGCA  
TGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGACAGGAGCGTGAGTTGTAGCGGCT  
ATTAGCTGGAGTGGTACTACCACGAATATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG  
ATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATACGGTGTATCTGCAAATGA  
ACAGCCTGAAGCCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGCGCAGCAGATGGT  
TCCTGGCGGGGAGTCTGCAACAATGTGTATGACTACTGGGGCCAGGGGAC  
CCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCACATCATCATCACCATCACGG

## Clone 8

GAGGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGGCTC  
TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGGCACCTTGAGTAGCTATGTCA  
TGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGATTGTAGCAGCT  
ATTAGGTCTAGTGGTAGCGCATGGTATGCAGACTCCGTGCAGGGCCGATT  
CACCATCTCCAGAGACGGCGCCAGGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACA  
GCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTACTACTGTGCAGCAAAGAAAGGA  
ATTACGGTCTTTACTCGTGACTCGTCGTATGACTACTGGGGCCAGGGGAC  
CCAGGTCACCGTCTCCT

## Clone 9

CGTGTCAGCTGCAGGCGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGGCTC  
ACTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACGCTCAGTAGTTATGCCA  
TGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGATCGTGAGTTGTAGCAGCT  
ATTAGCTGGAGTGGTACTAGGACATCGTATGCGGACTCCGTGAAGGGCCG  
ATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTATATCTGCAAATGA  
ACAGCCTGAAACCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGATGCGTTCA  
ATGCGTTCCAACCTCTATACCGTCTATGAGGCCCGCATGACTATGACTA  
CTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGC

8/8

## Clone 10

GAGGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTC  
TCTGAGACTCGCCTGTGCGGCCTCTGGACGCACCTTCAGGAGCTATGCCA  
TGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGAGCGCGAGGGGGTCTCATGT  
ATTAGTAGTAATGATGGTAGCACATATTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG  
ATTCAACCATCTCCAGAGACAATGCCGAAAACACGATGTATCTGCAAATGA  
ACGGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCTTCAGCAAAA  
TGGTATAGTGGACGTTTCTACCGGAGTGCCGCGGATGATTGTGCCCCCTTA  
CGAGTAT

## Clone 11

TGTGAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCT  
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTAACCATGCCATGG  
GCTGGTACCGCCAGCCTCCAGGGAAGCAGCGCGAGTTCGTGCGAAATATT  
TTTAGTGGCGGTTCGCATAAACTATGCAGACTTCGTGAAGGGCCGATTCA  
CATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAAAC  
TGAAACCTGAGGACACGGCCGTTCTATCTCTGTAATGCGTGGAGGTTAGGT  
TATGACTACTGGGGCCAGGGGAccCaggtcACCGTCTCCTCAGCGGCCGC  
ACAT

## Clone 12

GAGGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGGGGAGGATTGCTGCAGGCTGGGGACTC  
TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTACATATAACA  
TGGCGTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGCTTGTAGCAGCT  
ATCACTTGGAGTGGAGGTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT  
CACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTATCTCTGCAAATGGACA  
GCCTGAAACCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTACAGATCGCGGCGT  
GCTAGTTACTTCGGGGACCCCACTGACTTTCGTTTCTGGGGCCAGGGGAC  
CCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCC

FIGURE 6.3

0226-105-SEQ.ST25  
SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUT PASTEUR  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
ROUGEON, Francois  
LAFAYE, Pierre

<120> Fragments variables d'anticorps de camélidés  
à chaîne unique et leurs applications pour le  
diagnostic et le traitement de pathologies diverses

<130> S226EXT105

<160> 51

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: Peptide synthétique  
<400> 1  
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 5 10 15  
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
20 25 30  
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
35 40

<210> 2  
<211> 399  
<212> DNA  
<213> Camelidae

0226-105-SEQ.ST25

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(399)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 2

gcc gag gtg cag ctg cag gcg tct gga gga ggc ttg gtg cag gct ggg	48
Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly	
1 5 10 15	
ggg tct ctg aga ctc tcc tgc gca gcc tct gga agc acc ttc agg atc	96
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile	
20 25 30	
aat cgc atg ggc tgg tac cgc cag gct cca ggg aag cag cgc gag ttg	144
Asn Arg Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu	
35 40 45	
gtc gct agt att aat agt ggc ggt agt aca aac tat gca gac tcc gtg	192
Val Ala Ser Ile Asn Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag ggc aca gtg aat	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Gly Thr Val Asn	
65 70 75 80	
ctg aca atg aac agc ctg aaa cct gag gac acg gcc gtc tat tac tgt	288
Leu Thr Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
aat cga gta acc ccc tgg cct tac tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc	336
Asn Arg Val Thr Pro Trp Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr	
100 105 110	
gtc tcc tca gcg gcc gca gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg	384
Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu	
115 120 125	
aat ggg gcc gca tag	399
Asn Gly Ala Ala	
130	

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Camelidae

&lt;400&gt; 3

Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile
20 25 30

0226-105-SEQ.ST25

Asn Arg Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu  
 35 40 45  
 Val Ala Ser Ile Asn Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Gly Thr Val Asn  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Asn Arg Val Thr Pro Trp Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
 115 120 125  
 Asn Gly Ala Ala  
 130

<210> 4  
 <211> 405  
 <212> DNA  
 <213> camelidae

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(405)  
 <223>

<400> 4  
 gcc gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga ggc ttg gtg cag gct ggg 48  
 Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly  
 1 5 10 15  
 ggg tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga agc acc ttc agt atc 96  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ile  
 20 25 30  
 aat gtc ata gga tgg tac cgc cag gct cca ggg aag cag cgc gag ttg 144  
 Asn Val Ile Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu  
 35 40 45  
 gtc gca ggt att agt cgt agt ggt aac aca aat tat gca gac tcc gta 192  
 Val Ala Gly Ile Ser Arg Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 gag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac tac gcc aag aac aca gtg tat 240

0226-105-SEQ.ST25

Glu	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Tyr	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	
65					70					75					80	
ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aaa	cct	gag	gac	acg	gcc	gtc	tat	tat	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85				90					95			
cat	tcc	aag	acc	tat	ctt	cta	cat	atg	tac	tgg	ggc	cag	ggg	acc	cag	336
His	Ser	Lys	Thr	Tyr	Leu	Leu	His	Met	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	
			100					105					110			
gtc	acc	gtc	tcc	tca	gcg	gcc	gca	gaa	caa	aaa	ctc	atc	tca	gaa	gag	384
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	
		115					120					125				
gat	ctg	aat	ggg	gcc	gca	tag										405
Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala											
		130														

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 134

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 5

Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	
1				5				10					15			
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Thr	Phe	Ser	Ile	
		20					25						30			
Asn	Val	Ile	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	
		35				40						45				
Val	Ala	Gly	Ile	Ser	Arg	Ser	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50				55					60						
Glu	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Tyr	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	
65				70				75						80		
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85					90					95			
His	Ser	Lys	Thr	Tyr	Leu	Leu	His	Met	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	
		100					105						110			
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	
		115					120					125				
Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala											
		130														

0226-105-SEQ.ST25

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(411)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 6

gcc	gag	gtc	cag	ctg	cag	gcg	tct	gga	gga	ggc	ttg	gtg	cag	gct	ggg	48
Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	
1				5				10					15			

ggg	tct	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	tca	gcc	tct	gca	agc	acc	acc	ttc	agt	96
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Thr	Thr	Phe	Ser	
			20					25					30			

atg	aat	acc	atg	gcc	tgg	cac	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	cag	cgc	agc	144
Met	Asn	Thr	Met	Ala	Trp	His	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Ser	
			35				40					45				

ttg	gtc	gcc	ctt	att	gga	gca	act	cat	agt	att	aac	tat	gaa	gac	tcc	192
Leu	Val	Ala	Leu	Ile	Gly	Ala	Thr	His	Ser	Ile	Asn	Tyr	Glu	Asp	Ser	
	50				55						60					

gtg	aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aac	gcc	aag	aac	act	gtg	240
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	
65				70					75						80	

tat	tta	caa	atg	agc	ctg	aaa	cct	gag	gac	acg	gcc	gtc	tat	tac		288
Tyr	Leu	Gln	Met	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
			85					90					95			

tgt	aat	gac	tgg	tat	tgg	caa	atg	aaa	ggg	ggt	tcc	tgg	ggc	cag	ggg	336
Cys	Asn	Asp	Trp	Tyr	Trp	Gln	Met	Lys	Gly	Gly	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105					110			

acc	cag	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gcg	gcc	gca	gaa	caa	aaa	ctc	atc	tca	384
Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	
		115					120					125				

gaa	gag	gat	ctg	aat	ggg	gcc	gca	tag								411
Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala									
	130					135										

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 136

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae



0226-105-SEQ.ST25

&lt;400&gt; 7

Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ala Ser Thr Thr Phe Ser  
20 25 30

Met Asn Thr Met Ala Trp His Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Ser  
35 40 45

Leu Val Ala Leu Ile Gly Ala Thr His Ser Ile Asn Tyr Glu Asp Ser  
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val  
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Asn Asp Trp Tyr Trp Gln Met Lys Gly Gly Ser Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser  
115 120 125

Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
130 135

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 450

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(450)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 8

gcc gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga ggc tcg gtg cag cct ggg 48  
Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly  
1 5 10 15

ggg tct ctg aga ctc tcc tgc gca gcc tct gga ttc atc ttc ggt tgg 96  
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Gly Trp  
20 25 30

tct act atg agc tgg gtc cgc cag gct cca gga aag ggg tta gag tgg 144  
Page 6

0226-105-SEQ.ST25

Ser	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	
		35					40					45				
gtc	tca	act	att	tct	gga	gga	ggt	agt	gcc	aca	acc	tat	aca	gac	tcc	192
Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Thr	Thr	Tyr	Thr	Asp	Ser	
		50				55					60					
gtg	aag	ggc	cga	ttc	acc	att	tcc	aga	gac	agg	gcc	aag	aac	acg	ttg	240
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Arg	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	
		65			70					75				80		
tat	ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aaa	cct	gag	gac	acg	gcc	atc	tat	tac	288
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	
				85					90					95		
tgt	aat	gca	gat	gtg	agt	acg	ggt	ttc	cgg	tat	cag	cgt	aaa	gac	tac	336
Cys	Asn	Ala	Asp	Val	Ser	Thr	Gly	Phe	Arg	Tyr	Gln	Arg	Lys	Asp	Tyr	
			100					105					110			
tgg	ggc	cgg	ggg	acc	cag	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gaa	ccc	aag	aca	cca	384
Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Glu	Pro	Lys	Thr	Pro	
			115				120					125				
aaa	cca	caa	cca	gcg	gcc	gca	gaa	caa	aaa	ctc	atc	tca	gaa	gag	gat	432
Lys	Pro	Gln	Pro	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	
		130				135					140					
ctg	aat	ggg	gcc	gca	tag											450
Leu	Asn	Gly	Ala	Ala												
					145											

<210> 9  
 <211> 149  
 <212> PRT  
 <213> camelidae

<400> 9

Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Pro	Gly	
1			5					10					15			
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	Gly	Trp	
		20					25					30				
Ser	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	
		35					40					45				
Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Thr	Thr	Tyr	Thr	Asp	Ser	
		50				55					60					
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Arg	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	
		65			70				75					80		
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	
				85					90					95		

0226-105-SEQ.ST25

Cys Asn Ala Asp Val Ser Thr Gly Phe Arg Tyr Gln Arg Lys Asp Tyr  
                   100                  105                  110

Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr Pro  
           115                  120                  125

Lys Pro Gln Pro Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp  
       130                  135                  140

Leu Asn Gly Ala Ala  
   145

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 10

gatgtgcagc tgcaggcgtc tggrrggagg

29

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 11

cgccatcaag gtaccagttg a

21

<210> 12

<211> 45

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 12

catgccatga ctcgcggccc agccggccat ggccgagkts cagct

45

0226-105-SEQ.ST25

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: amorce

&lt;400&gt; 13

ggactagttg cggccgctga ggagacggtg acctg

35

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: amorce

&lt;400&gt; 14

ggactagttg cggccgctgg ttgtggtttt ggtgtcttgg g

41

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 384

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 15

atgggccgat gtcagctgca ggcgtctgga ggaggcttgg tgcagccggg ggggtctctg 60

agactctcct gtgcagcctc tggattcact ttggagtatt atgccttagc ctggttccgc 120

caggccccag ggaaggagcg tgtggggatt tcttgattta gtagtactaa tggtcgcgca 180

gactatgtag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaacgcg 240

ttctatctgc aaatgaacag cctgaaacct gaggacacag ccgtttacta ctgtgcagca 300

gcaatgtgga aatgccaaatt aatgatgtcc tcttctaatt ataccaaaat ttggggccag 360

ggcaccagg tcaccgtctc ctca 384

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 381

0226-105-SEQ.ST25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

<400> 16  
 camdaggccg aggtccgctg caggcgtctg ggggaggctt ggtgcagcct ggggggtctc 60  
 tgacactctc ctgtatagcc tctggattca ctttggatta ttatagtgtg ggctggttcc 120  
 gccaggcccc agggagaag cgtgagaggg tctcatgtac tgggccgaat ggtgaaagca 180  
 caaactatgc agactccgtg aaggggcgat tcaccatctc cagagacaac gccaagaaca 240  
 cggcgtatct gcaaatgaac agcctgaaac ctgacgacac tgccgtttat tactgtgcag 300  
 cagtcgcact ccacaaatgt acctgggccc gtatggatga atatgactac tcaggccagg 360  
 ggaccaggt cacggtctcc t 381

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 396

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

<400> 17  
 atggccgatg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggcttag tgcagcctgg ggagtctctg 60  
 acgctctcct gtgcagccta tggattcaca ttggattatt gtgcggtagg ctggttccgc 120  
 caggccccag ggaaggagcg cgaggagtc gcatgtattg gcagtagttt aggtcgcaca 180  
 gattatgcag actccgtgaa gggccgattc accatctccc gagacaacgc caagaacacg 240  
 atgtatctgc aaatgaacga cctgaaacct gaggacgcag ccgtttatta ctgtgcagcg 300  
 aagatagggg gggcaatgtg tgtcccaaat gagtatgact actggggcca ggggaccag 360  
 gtcaccgtct cctcggaacc caagacacca aagcca 396

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 396

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

<400> 18  
 gtgcagctgc aggcgtctgg gggaggattg gtgcaggctg ggggctcttt gaatctctcc 60  
 tgtgcagcct ctggacgcag cttcagtggc tatgccctgg gctggttccg ccaggctccg 120  
 ggggaaggagc gtgaatttgt aggagctatt agctggattg gtggaaggac atactatgca 180  
 gtgtccgtga agggccgatt caccatcacc agagacaacg ccaagaacac acttaatctg 240  
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcggc caaaggttct 300

## 0226-105-SEQ.ST25

gatggtgatt acttcagcat ccagaaatat gacagctggg gccagggaac ccaggtcacc 360  
gtctcctcag aacccaagac accaaaacca caacca 396

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 413

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 19

atggccgatg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggattgg tgcaggctgg gggctctttg 60  
aatctctcct gtgcagcctc tggacgcagc ttcagtggct atgccctggg ctggttccgc 120  
caggctcccg ggaaggagcg tgaatttgta ggagctatta gctggattgg tggagggaca 180  
tactatgcag tgtccgtgaa gggccgattc accatcacca gagacaacgc caagaacaca 240  
cttaatctgc aaatgaacag cctgaaacct gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcggcc 300  
aaaggttctg atggtgatta cttcagcatc cagaaatatg acagctgggg ccagggaacc 360  
caggtcaccg tctcctcaga acccaagaca ccaaaccac aaccagcggc cgc 413

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 263

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 20

atggccgatg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggcttgg tgcagcctgg gggttctccg 60  
ggactctcct gtgcagcctc cggattcacc tttaggacgt ctgacatgag ttgggtccgc 120  
caggctccag ggaaggggct cgaatgggtc tcatatattg atagtggtag tggagggaaa 180  
ctgtatgcgg actccgcgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaacacg 240  
gtgtatctgc aaatgaacag cct 263

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 294

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 21

atggccgatg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggcttgg tgcagcctgg gggttctccg 60  
ggactctcct gtgcagcctc cggattcacc tttaggacgt ctgacatgag ttgggtccgc 120

## 0226-105-SEQ.ST25

caggctccag ggaaggggct cgaatgggtc tcatatattg atagtggtag tggaaggaaa 180  
 ctgtatgcgg actccgcgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaacacg 240  
 gtgtatctgc aaatgaacag cctgaaaccc gaggacacag gcgtttatta ctgt 294

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 127

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 22

Gly Arg Cys Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Glu Tyr  
 20 25 30

Tyr Ala Leu Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Val Gly  
 35 40 45

Ile Ser Cys Ile Ser Ser Thr Asn Gly Arg Ala Asp Tyr Val Asp Ser  
 50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Phe  
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Ala Ala Met Trp Lys Cys Gln Leu Met Met Ser Ser Ser Asn  
 100 105 110

Tyr Thr Lys Ile Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 23

Gly Arg Gly Pro Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15

0226-105-SEQ.ST25

Gly Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ile Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr  
                   20                  25                  30

Tyr Ser Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Glu Arg  
           35                  40                  45

Val Ser Cys Thr Gly Pro Asn Gly Glu Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser  
       50                  55                  60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ala  
   65                  70                  75                  80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
                   85                  90                  95

Cys Ala Ala Val Ala Leu Pro Gln Cys Thr Trp Ala Arg Met Asp Glu  
          100                 105                 110

Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
      115                 120                 125

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 131

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 24

Ala Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
   1                  5                 10                 15

Glu Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Tyr Gly Phe Thr Leu Asp Tyr  
      20                 25                 30

Cys Ala Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly  
      35                 40                 45

Val Ala Cys Ile Gly Ser Ser Leu Gly Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser  
      50                 55                 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met  
   65                 70                 75                 80

Tyr Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr  
                  85                 90                 95

Cys Ala Ala Lys Ile Gly Gly Ala Met Cys Val Pro Asn Glu Tyr Asp  
      100                 105                 110



0226-105-SEQ.ST25

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr  
 115 120 125

Pro Lys Pro  
 130

<210> 25

<211> 132

<212> PRT

<213> . camelidae

<400> 25

Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

Leu Asn Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Phe Ser Gly Tyr Ala  
 20 25 30

Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Gly  
 35 40 45

Ala Ile Ser Trp Ile Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Val Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Asn Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Ala Lys Gly Ser Asp Gly Asp Tyr Phe Ser Ile Gln Lys Tyr Asp Ser  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr Pro  
 115 120 125

Lys Pro Gln Pro  
 130

<210> 26

<211> 97

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 26

## 0226-105-SEQ.ST25

Ala Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
1 5 10 15

Gly Ser Pro Gly Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Thr  
20 25 30

Ser Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Ser Tyr Ile Asp Ser Gly Ser Gly Arg Lys Leu Tyr Ala Asp Ser  
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val  
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys

<210> 27

<211> 130

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 27

Ala Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Asp Ser Ile  
20 25 30

Asn Val Met Ala Trp Tyr Arg Pro Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu  
35 40 45

Val Ala Ala Ile Ala Arg Asp Ala Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Leu  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Arg Met Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Asn Ala Glu Ala Leu Met His Thr Gln Phe Pro Arg His Tyr Trp Gly  
100 105 110

0226-105-SEQ.ST25  
 Pro Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr Pro Lys Pro  
 115 120 125

Gln Pro  
 130

<210> 28

<211> 381

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(381)

<223>

<400> 28  
 gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg ggg ggc ttg gtg gaa cct ggg ggg 48  
 Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gaa agc atc tgg gtc aat gta 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Ser Ile Trp Val Asn Val  
 20 25 30  
 atg gac tgg tac cgc cag gct cca ggg aag cag cgc gag ttg gtc gca 144  
 Met Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala  
 35 40 45  
 gct att act cgt ggt ggt gtc aca aac tat gca gac tcc gtg aag ggc 192  
 Ala Ile Thr Arg Gly Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly  
 50 55 60  
 cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac atg atg ttc ctg caa 240  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Phe Leu Gln  
 65 70 75 80  
 atg cac agc ctg cta cct gag gac acg gcc gtc tat tat tgc cat gcg 288  
 Met His Ser Leu Leu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Ala  
 85 90 95  
 cgt aca tgg aga gac tat tgg ggc cag ggg acc cag gtc acg tct cct 336  
 Arg Thr Trp Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Ser Pro  
 100 105 110  
 cca gcg gcc gca cat cat cat cac cat cac ggg gcc gca gaa caa 381  
 Pro Ala Ala Ala His His His His His His Gly Ala Ala Glu Gln  
 115 120 125

<210> 29

<211> 127

<212> PRT

0226-105-SEQ.ST25

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 29

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Ser Ile Trp Val Asn Val  
20 25 30

Met Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala  
35 40 45

Ala Ile Thr Arg Gly Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly  
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Phe Leu Gln  
65 70 75 80

Met His Ser Leu Leu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Ala  
85 90 95

Arg Thr Trp Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Ser Pro  
100 105 110

Pro Ala Ala Ala His His His His His His Gly Ala Ala Glu Gln  
115 120 125

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(357)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 30

gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct ggg ggg 48  
Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gca agc atc ttc agt atc gat 96  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Ser Ile Phe Ser Ile Asp  
20 25 30

ggc atg ggc tgg tac cgc cag gct cca gga aag cag cgc gag ttg gtc 144  
Page 17

0226-105-SEQ.ST25

Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
           35                  40                  45

gca ggt att act agt ggt ggt agc aca aac tat gca gac tcc gtg aag      192  
 Ala Gly Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
       50                  55                  60

ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac atg atg ttc ctg      240  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Phe Leu  
       65                  70                  75                  80

caa atg cgc agc ctg cta cct gag aac acg gcc gtc tat tac tgt cat      288  
 Gln Met Arg Ser Leu Leu Pro Glu Asn Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His  
                   85                  90                  95

gcg cgt aca tgg aga gac tat tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc      336  
 Ala Arg Thr Trp Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
                   100                  105                  110

tcc tca gcg gcc gca cat cat      357  
 Ser Ser Ala Ala Ala His His  
       115

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 31

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                  5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Ser Ile Phe Ser Ile Asp  
           20                  25                  30

Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
       35                  40                  45

Ala Gly Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
       50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Phe Leu  
       65                  70                  75                  80

Gln Met Arg Ser Leu Leu Pro Glu Asn Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His  
           85                  90                  95

Ala Arg Thr Trp Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
           100                  105                  110

Ser Ser Ala Ala Ala His His  
       115

0226-105-SEQ.ST25

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 348

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(348)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 32

gag	gtg	cag	ctg	cag	gcg	tct	ggg	gga	gga	ttg	gtg	cag	acc	ggg	ggc	48
Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Thr	Gly	Gly	
1			5				10					15				

tct	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gta	gcc	tct	gga	cgc	acc	ttc	agc	agc	tac	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20				25					30				

gcc	atg	ggc	tgg	ttc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	gag	cga	gag	ttt	gta	144
Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	
		35				40					45					

gca	gct	gtt	agc	cag	agt	ggt	gtt	cgt	aca	aac	tat	gca	gac	tcc	gtg	192
Ala	Ala	Val	Ser	Gln	Ser	Gly	Val	Arg	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50				55					60						

aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aac	gcc	aag	ttc	acg	gtg	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Phe	Thr	Val	Tyr	
65			70						75					80		

ctg	caa	acg	aac	agc	ctg	aaa	cct	gag	gac	acg	gcc	ctt	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Thr	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	
			85					90						95		

gca	gcc	act	acg	aaa	ccc	ttt	ttg	ggg	gta	cga	atg	ttt	caa	cca	gag	336
Ala	Ala	Thr	Thr	Lys	Pro	Phe	Leu	Gly	Val	Arg	Met	Phe	Gln	Pro	Glu	
			100				105						110			

tac	tgg	ggc	cag													348
Tyr	Trp	Gly	Gln													
		115														

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 33

Glu	val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	val	Gln	Thr	Gly	Gly
1			5						10					15	

0226-105-SEQ.ST25

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
35 40 45

Ala Ala Val Ser Gln Ser Gly Val Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Phe Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Thr Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala Thr Thr Lys Pro Phe Leu Gly Val Arg Met Phe Gln Pro Glu  
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln  
115

<210> 34

<211> 360

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<223>

<400> 34

gat gtc cag ctg cag gcg tct gga gga ggc ttg gtg cag cct ggg ggg 48  
Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga agc atc ttc agt aac cat 96  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn His  
20 25 30

gcc atg ggc tgg tac cgc cag cct cca ggg aag cag cgc gag ttc gtc 144  
Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val  
35 40 45

gca aat att ttt agt ggc ggt cgc ata aac tat gca gac ttc gtg aag 192  
Ala Asn Ile Phe Ser Gly Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Phe Val Lys  
50 55 60

ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aat acg gtg tat ctg 240  
Page 20

## 0226-105-SEQ.ST25

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 caa atg aac aaa ctg aaa cct gag gac acg gcc gtc tat ccc tgt aat 288  
 Gln Met Asn Lys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Pro Cys Asn  
 85 90 95  
 gcg tgg agg tta ggt tat gac tat tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc 336  
 Ala Trp Arg Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 gtc tcc tca gcg gcc gca cat cat 360  
 Val Ser Ser Ala Ala His His  
 115 120

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 35

Asp val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn His  
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val  
 35 40 45

Ala Asn ile Phe Ser Gly Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Phe val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Lys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Pro Cys Asn  
 85 90 95

Ala Trp Arg Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110

val ser ser Ala Ala Ala His His  
 115 120

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae



0226-105-SEQ.ST25

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(357)

&lt;223&gt;

<400> 36  
gat gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct ggg ggg 48  
Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga atc gtc ttc aga gtc agt 96  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Val Phe Arg Val Ser  
20 25 30  
acc atg ggc tgg tac cgc cag gct cca ggg aag cag cgc gag ttg gtc 144  
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
35 40 45  
gca act att tct agt ggt ggt agt aca aac tat gca gac tcc gtg aag 192  
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60  
ggc cga ttc acc atc tac aga gac aac gcc aag aac acg gtg tat ctg 240  
Gly Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80  
caa atg aac agc ctg aaa cct gag gac acg gcc gtc tat tac tgt aat 288  
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
85 90 95  
gca aat aca gga ctc cgt acc ctt tct ttc tgg ggc cag ggg acc cag 336  
Ala Asn Thr Gly Leu Arg Thr Leu Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln  
100 105 110  
gtc acc gtc tcc tca gcg gcc 357  
Val Thr Val Ser Ser Ala Ala  
115

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 37

Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Val Phe Arg Val Ser  
20 25 30  
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
35 40 45

0226-105-SEQ.ST25

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
85 90 95

Ala Asn Thr Gly Leu Arg Thr Leu Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ala  
115

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 396

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(396)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 38

gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga gga ttg gtg cag gct ggg ggc 48  
Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gaa cgc acc ttc agt aac gct 96  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Thr Phe Ser Asn Ala  
20 25 30

cgc atg gcc tgg ttc cgc cag gct cca gga cag gag cgt gag ttt gta 144  
Arg Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Phe Val  
35 40 45

gcg gct att agc tgg agt ggt act acc acg aac tat gca gac tcc gtg 192  
Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aat acg gtg tat 240  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aag cct gag gac acg gcc gtt tat tac tgc 288  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

gca gca gat ggt tcc tgg cgg gga gtc tgc aac aat gtg tat gac tac 336

0226-105-SEQ.ST25  
 Ala Ala Asp Gly Ser Trp Arg Gly Val Cys Asn Asn Val Tyr Asp Tyr  
                   100                  105                  110  
 tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc tcc tca gcg gcc gca cat cat 384  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala His His  
                   115                  120                  125  
 cat cac cat cac 396  
 His His His His  
                   130

<210> 39  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> camelidae

<400> 39  
 Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
   1                  5                  10                  15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Thr Phe Ser Asn Ala  
                   20                  25                  30  
 Arg Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Phe Val  
                   35                  40                  45  
 Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                  55                  60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
   65                  70                  75                  80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                  90                  95  
 Ala Ala Asp Gly Ser Trp Arg Gly Val Cys Asn Asn Val Tyr Asp Tyr  
                   100                  105                  110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala His His  
                   115                  120                  125  
 His His His His  
                   130

<210> 40  
 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> camelidae

0226-105-SEQ.ST25

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(366)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 40

gag	gtg	cag	ctg	cag	gcg	tct	gga	gga	gga	ttg	gtg	cag	gct	ggg	ggc	48
Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	
1			5				10					15				

tct	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ggc	acc	ttg	agt	agc	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Leu	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			

gtc	atg	ggc	tgg	ttc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	gag	cgt	gag	att	gta	144
Val	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Ile	Val	
		35				40					45					

gca	gct	att	agg	tct	agt	ggg	agc	gca	tgg	tat	gca	gac	tcc	gtg	cag	192
Ala	Ala	Ile	Arg	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	Trp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Gln	
		50				55					60					

ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	ggc	gcc	agg	aac	acg	gtg	tat	ctg	240
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Gly	Ala	Arg	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	
65				70				75						80		

caa	atg	aac	agc	ctg	aaa	cct	gag	gac	acg	gcc	gtt	tac	tac	tgt	gca	288
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
			85					90						95		

gca	aag	aaa	gga	att	acg	gtc	ttt	act	cgt	gac	tcg	tcg	tat	gac	tac	336
Ala	Lys	Lys	Gly	Ile	Thr	Val	Phe	Thr	Arg	Asp	Ser	Ser	Tyr	Asp	Tyr	
			100					105					110			

tgg	ggc	cag	ggg	acc	cag	gtc	acc	gtc	tcc							366
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser							
		115				120										

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 41

Glu	val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	val	Gln	Ala	Gly	Gly	
1			5				10					15				

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Leu	Ser	Ser	Tyr	
			20					25				30				

val	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Ile	val	
		35				40					45					

0226-105-SEQ.ST25

Ala Ala Ile Arg Ser Ser Gly Ser Ala Trp Tyr Ala Asp Ser Val Gln  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Arg Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Ala Lys Lys Gly Ile Thr Val Phe Thr Arg Asp Ser Ser Tyr Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
 115 120

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 384

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(384)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 42

cgt gtc cag ctg cag gcg tct gga gga gga ttg gtg cag gct ggg ggc 48  
 Arg Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

tca ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga cgc acg ctc agt agt tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Leu Ser Ser Tyr  
 20 25 30

gcc atg ggc tgg ttc cgc cag gct cca ggg aag gat cgt gag ttt gta 144  
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val  
 35 40 45

gca gct att agc tgg agt ggt act agg aca tcg tat gcg gac tcc gtg 192  
 Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac acg gta tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aaa ccc gag gac acg gcc gtt tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

gcg atg cgt tca atg cgt tcc aac ctc tat acc gtc tat gag gcc ccg 336

0226-105-SEQ.ST25  
 Ala Met Arg Ser Met Arg Ser Asn Leu Tyr Thr Val Tyr Glu Ala Pro  
                   100                  105                  110  
 cat gac tat gac tac tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc tcc tca 384  
 His Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
                   115                  120                  125

<210> 43  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> camelidae

<400> 43  
 Arg Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
   1                  5                  10                  15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Leu Ser Ser Tyr  
                   20                  25                  30  
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe val  
                   35                  40                  45  
 Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser val  
   50                  55                  60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
   65                  70                  75                  80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                  90                  95  
 Ala Met Arg Ser Met Arg Ser Asn Leu Tyr Thr Val Tyr Glu Ala Pro  
                   100                  105                  110  
 His Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
                   115                  120                  125

<210> 44  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> camelidae

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(357)

0226-105-SEQ.ST25

&lt;223&gt;

<400> 44  
 gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga gga ttg gtg cag gct ggg ggc 48  
 Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

tct ctg aga ctc gcc tgt gcg gcc tct gga cgc acc ttc agg agc tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Arg Ser Tyr  
 20 25 30

gcc atg ggc tgg ttc cgc cag gct cca gga aag gag cgc gag ggg gtc 144  
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
 35 40 45

tca tgt att agt agt aat gat ggt agc aca tat tat gca gac tcc gtg 192  
 Ser Cys Ile Ser Ser Asn Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc gaa aac acg atg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Thr Met Tyr  
 65 70 75 80

ctg caa atg aac ggc ctg aaa cct gag gac acg gcc gtt tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

gct tca gca aaa tgg tat agt gga cgt ttc tac cgg agt gcc gcg gat 336  
 Ala Ser Ala Lys Trp Tyr Ser Gly Arg Phe Tyr Arg Ser Ala Ala Asp  
 100 105 110

gat tgt gcc cct tac gag tat 357  
 Asp Cys Ala Pro Tyr Glu Tyr  
 115

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 45

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Arg Ser Tyr  
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly val  
 35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Asn Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Thr Met Tyr  
 65 70 75 80

## 0226-105-SEQ.ST25

Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ser Ala Lys Trp Tyr Ser Gly Arg Phe Tyr Arg Ser Ala Ala Asp  
100 105 110

Asp Cys Ala Pro Tyr Glu Tyr  
115

<210> 46

<211> 354

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<223>

<400> 46

tgt gag ctg cag gcg tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct ggg ggg tct 48  
Cys Glu Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
1 5 10 15

ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga agc atc ttc agt aac cat gcc 96  
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn His Ala  
20 25 30

atg ggc tgg tac cgc cag cct cca ggg aag cag cgc gag ttc gtc gca 144  
Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val Ala  
35 40 45

aat att ttt agt ggc ggt cgc ata aac tat gca gac ttc gtg aag ggc 192  
Asn Ile Phe Ser Gly Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly  
50 55 60

cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac acg gtg tat ctg caa 240  
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
65 70 75 80

atg aac aaa ctg aaa cct gag gac acg gcc gtc tat ctc tgt aat gcg 288  
Met Asn Lys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys Asn Ala  
85 90 95

tgg agg tta ggt tat gac tac tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc 336  
Trp Arg Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
100 105 110

tcc tca gcg gcc gca cat 354  
Ser Ser Ala Ala Ala His  
115



0226-105-SEQ.ST25

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 47

Cys Glu Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn His Ala  
 20 25 30

Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val Ala  
 35 40 45

Asn Ile Phe Ser Gly Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly  
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 65 70 75 80

Met Asn Lys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys Asn Ala  
 85 90 95

Trp Arg Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ser Ala Ala Ala His  
 115

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 375

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(375)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 48

gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga gga ttg ctg cag gct ggg gac  
 Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Leu Gln Ala Gly Asp  
 1 5 10 15

48

## 0226-105-SEQ.ST25

tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga cgc acc ttc agt aca tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30

aac atg gcg tgg ttc cgc cag gct cca ggg aag gag cgt gag ctt gta 144  
 Asn Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

gca gct atc act tgg agt gga ggt aca tac tat gca gac tcc gtg aag 192  
 Ala Ala Ile Thr Trp Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac acg gta tct ctg 240  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Ser Leu  
 65 70 75 80

caa atg gac agc ctg aaa ccc gag gac acg gcc gtt tat tac tgt aca 288  
 Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr  
 85 90 95

cga tcg cgg cgt gct agt tac ttc ggg gac ccc act gac ttt cgt tcc 336  
 Arg Ser Arg Arg Ala Ser Tyr Phe Gly Asp Pro Thr Asp Phe Arg Ser  
 100 105 110

tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc tcc tca gcg gcc 375  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala  
 115 120 125

<210> 49  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> camelidae

<400> 49  
 Glu val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Leu Gln Ala Gly Asp  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Ile Thr Trp Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr  
 85 90 95  
 Arg Ser Arg Arg Ala Ser Tyr Phe Gly Asp Pro Thr Asp Phe Arg Ser  
 100 105 110

0226-105-SEQ.ST25

Trp Gly Gln Gly Thr Gln val Thr val ser ser Ala Ala  
115 120 125

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: amorce

&lt;400&gt; 50

caggaaacag ctatgacc

18

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: amorce

&lt;400&gt; 51

ctcttctgag atgagttttt g

21

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
27 mai 2004 (27.05.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/044204 A3

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C07K 14/47, 16/18,  
G01N 33/68, A61K 39/395, A61P 25/28

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/003319

(22) Date de dépôt international :  
6 novembre 2003 (06.11.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/13866 6 novembre 2002 (06.11.2002) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : IN-  
STITUT PASTEUR [FR/FR]; 28 rue du Docteur Roux,  
F-75724 Paris cedex 15 (FR). CENTRE NATIONAL DE  
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue  
Michel-Ange, F-75794 Paris cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :  
ROUGEON, François [FR/FR]; 36 rue Fontaine, F-92310  
Sevres (FR). LAFAYE, Pierre [FR/FR]; 31 Boulevard  
Camelinat, F-92240 MALAKOFF (FR).

(74) Mandataire : CABINET ORES; 36, rue de St Péters-  
bourg, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,  
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (BW, GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale  
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues

(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 10 septembre 2004

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: VARIABLE FRAGMENTS OF SINGLE-CHAIN CAMELIDE ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR DIAG-  
NOSING AND TREATING VARIOUS PATHOLOGIES

(54) Titre : FRAGMENTS VARIABLES D'ANTICORPS DE CAMELIDES A CHAÎNE UNIQUE ET LEURS APPLICATIONS  
POUR LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DIVERSES.

(57) Abstract: The invention concerns variable fragments of single-chain camelid antibodies directed against amyloid beta-pep-  
tide 1-42 as well as against phosphorylcholine. The invention also concerns uses thereof for treating and diagnosing pathologies  
associated with molecules identified by said antibodies, and in particular neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease  
and infectious diseases induced by pathogens (viruses or bacteria).

(57) Abrégé : Fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigée contre le peptidyle B-amyloïde 1-42 ainsi que  
contre la phosphorylcholine. Est également décrit, l'application pour le traitement ou le diagnostic des pathologies associées aux  
molécules reconnues par ces anticorps, et notamment les maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer ou des ma-  
ladies infectieuses induites par des agents pathogènes (virus ou bactéries).

WO 2004/044204 A3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 03/03319

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/68 A61K39/395 A61P25/28				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, SCISEARCH				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	VAN DER LINDEN R ET AL: "Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 240, no. 1-2, June 2000 (2000-06), pages 185-195, XP004201577 ISSN: 0022-1759 page 186, right-hand column, paragraph 1 page 188, right-hand column, paragraph 2 -page 191, right-hand column, paragraph 3; figure 3; table 2  -/-	1,19,22, 23,27, 30,31,34		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
<b>* Special categories of cited documents:</b> <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;">           *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            *E* earlier document but published on or after the international filing date            *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)            *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means            *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="vertical-align: top;">           *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention            *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.            *&amp;* document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search  7 July 2004		Date of mailing of the international search report  27. 07. 2004		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Steffen, P		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03319

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 954 978 A (UNILEVER PLC ;UNILEVER NV (NL)) 10 November 1999 (1999-11-10)  examples 1,2,8	1,19,22, 23, 25-27, 30,31,34
X	WO 00/65057 A (UNILEVER PLC ;LEVER HINDUSTAN LTD (IN); UNILEVER NV (NL)) 2 November 2000 (2000-11-02) page 8, line 25 -page 9, line 1; examples 1,2	1,19,22, 23,26, 27,30
X	DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933 page 171 -page 175; tables 1,2	1,19,22, 23,25,26
X	HAMERS-CASTERMAN C ET AL: "NATURALLY OCCURRING ANTIBODIES DEVOID OF LIGHT CHAINS" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 363, 3 June 1993 (1993-06-03), pages 446-448, XP002048619 ISSN: 0028-0836 page 446 -page 448; figures 1,2	1
P,X	WO 03/062415 A (DEKKER SYLVIA ;DRABEK DUBRAVKA (NL); ERASMUS UNIVERSITY (NL); GROS) 31 July 2003 (2003-07-31) page 12 -page 13 page 36 -page 43	1,30
A	MARTIN F ET AL: "Affinity selection of a camelized VH domain antibody inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 10, no. 5, May 1997 (1997-05), pages 607-614, XP002117441 ISSN: 0269-2139 the whole document	

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03319

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ARBABI GHARROUDI M ET AL: "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 414, no. 3, 15 September 1997 (1997-09-15), pages 521-526, XP004261105 ISSN: 0014-5793 the whole document	
A	MUYLDERMANS S: "Single domain camel antibodies: current status." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. NETHERLANDS JUN 2001, vol. 74, no. 4, June 2001 (2001-06), pages 277-302, XP002236934 ISSN: 0168-1656 cited in the application page 286, left-hand column, paragraph 3 -page 290, right-hand column, paragraph 1; figure 5; table 1	
A	WO 00/72880 A (SCHENK DALE B ;YEDNOCK TED (US); BARD FREDERIQUE (US); NEURALAB LT) 7 December 2000 (2000-12-07) page 68 -page 69	1,12-18
A	WO 01/62801 A (VASQUEZ MAXIMILIANO ;BALES KELLY R (US); PAUL STEVEN M (US); DEMAT) 30 August 2001 (2001-08-30) example 2	1,12-18
A	BARD F ET AL: "Peripherally administered antibodies against amyloid beta- peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 6, no. 8, August 2000 (2000-08), pages 916-919, XP002154518 ISSN: 1078-8956 cited in the application table 1	1,12-18
A	FRENKEL D ET AL: "MODULATION OF ALZHEIMER'S BETA-AMYLOID NEUROTOXICITY BY SITE-DIRECTED SINGLE-CHAIN ANTIBODY" NEUROIMMUNOMODULATION, KARGER, BASEL,, CH, vol. 6, no. 6, November 1999 (1999-11), page 444 XP008000881 ISSN: 1021-7401 abstract	1,12-18

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/FR 03/03319

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DUMOULIN M ET AL: "A single-domain antibody fragment that stabilises the native state of two amyloidogenic lysozyme variants and hence prevents aggregation." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 30, no. 3, 2002, page A93 XP002236935 676th Meeting of the Biochemical Society;Edinburgh, UK; April 08-10, 2002 ISSN: 0300-5127 abstract	1,12-18
A	SOLOMON B: "Immunotherapeutic strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease." DNA AND CELL BIOLOGY. UNITED STATES NOV 2001, vol. 20, no. 11, November 2001 (2001-11), pages 697-703, XP002236936 ISSN: 1044-5498 page 701, left-hand column, paragraph 4 -page 702, left-hand column, paragraph 1	1,12-18



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 03/03319

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**see supplementary sheet**

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/FR 03/03319

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1 (partially), 19-36

Use of single-chain camel antibodies to pathogens that do not secrete toxins or do not contain HCV protease NS3 for detecting said pathogen; variable fragment of single-chain camel antibodies to pathogens that do not secrete toxins and can bind to a bacterial wall adhesion molecule, particularly phosphorylcholine; cDNA coding for a fragment of this kind; vectors and host cells, and compositions containing said cDNA and/or variable fragment; and uses of said fragments and cDNA.

2. claims: 1 (partially), 12-18

Use of single-chain camel antibodies to beta-amyloid peptide 1-42 for detecting a disease including deposits of an insoluble amyloid substance; variable fragment of single-chain camel antibodies to beta-amyloid peptide 1-42; cDNA and cDNA library coding for a fragment of this kind; vectors and host cells, and compositions containing said cDNA and/or variable fragment; and uses of said fragments and cDNA.

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/FR 03/03319

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0954978	A	10-11-1999	EP 0954978 A1	10-11-1999
			AU 2729599 A	27-09-1999
			WO 9946300 A1	16-09-1999
			EP 1062245 A1	27-12-2000
			US 6517829 B1	11-02-2003
WO 0065057	A	02-11-2000	AU 4120200 A	10-11-2000
			BR 0009866 A	08-01-2002
			CA 2370351 A1	02-11-2000
			CN 1351662 T	29-05-2002
			WO 0065057 A1	02-11-2000
			EP 1169453 A1	09-01-2002
			ID 30380 A	29-11-2001
			US 2003165511 A1	04-09-2003
			US 6528056 B1	04-03-2003
			ZA 200107822 A	23-09-2002
WO 03062415	A	31-07-2003	WO 03062415 A2	31-07-2003
WO 0072880	A	07-12-2000	AU 5303100 A	18-12-2000
			BG 106241 A	30-08-2002
			BR 0011000 A	19-02-2002
			CA 2370311 A1	07-12-2000
			CN 1359301 T	17-07-2002
			CZ 20013824 A3	13-11-2002
			DE 10084643 T0	11-07-2002
			EE 200100626 A	17-02-2003
			EP 1185298 A2	13-03-2002
			GB 2368794 A	15-05-2002
			HU 0201250 A2	28-08-2002
			JP 2003517461 T	27-05-2003
			NO 20015773 A	25-01-2002
			NZ 515403 A	28-05-2004
			SK 16982001 A3	06-11-2002
			TR 200103447 T2	22-04-2002
			TR 200202231 T2	21-11-2002
			WO 0072880 A2	07-12-2000
			US 6710226 B1	23-03-2004
			US 6750324 B1	15-06-2004
			US 6743427 B1	01-06-2004
			ZA 200109487 A	17-02-2003
WO 0162801	A	30-08-2001	AU 4178601 A	03-09-2001
			BR 0108676 A	07-01-2003
			CA 2400559 A1	30-08-2001
			CN 1426423 T	25-06-2003
			CZ 20022851 A3	17-09-2003
			DE 1257584 T1	28-05-2003
			EP 1257584 A2	20-11-2002
			ES 2184660 T1	16-04-2003
			HU 0204074 A2	28-03-2003
			JP 2003523764 T	12-08-2003
			NO 20023957 A	22-10-2002
			NZ 520800 A	30-04-2004
			SK 12212002 A3	07-10-2003
			TR 200202799 T3	21-03-2003
			WO 0162801 A2	30-08-2001

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 03/03319

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/68 A61K39/395 A61P25/28

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, SCISEARCH

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>VAN DER LINDEN R ET AL: "Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 240, no. 1-2, juin 2000 (2000-06), pages 185-195, XP004201577</p> <p>ISSN: 0022-1759</p> <p>page 186, colonne de droite, alinéa 1</p> <p>page 188, colonne de droite, alinéa 2</p> <p>-page 191, colonne de droite, alinéa 3;</p> <p>figure 3; tableau 2</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	<p>1,19,22, 23,27, 30,31,34</p>

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 juillet 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27.07.2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Steffen, P

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 03/03319

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 954 978 A (UNILEVER PLC ;UNILEVER NV (NL)) 10 novembre 1999 (1999-11-10)  exemples 1,2,8	1,19,22, 23, 25-27, 30,31,34
X	WO 00/65057 A (UNILEVER PLC ;LEVER HINDUSTAN LTD (IN); UNILEVER NV (NL)) 2 novembre 2000 (2000-11-02) page 8, ligne 25 -page 9, ligne 1; exemples 1,2	1,19,22, 23,26, 27,30
X	DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 septembre 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933 page 171 -page 175; tableaux 1,2	1,19,22, 23,25,26
X	HAMERS-CASTERMAN C ET AL: "NATURALLY OCCURRING ANTIBODIES DEVOID OF LIGHT CHAINS" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 363, 3 juin 1993 (1993-06-03), pages 446-448, XP002048619 ISSN: 0028-0836 page 446 -page 448; figures 1,2	1
P,X	WO 03/062415 A (DEKKER SYLVIA ;DRABEK DUBRAVKA (NL); ERASMUS UNIVERSITY (NL); GROS) 31 juillet 2003 (2003-07-31) page 12 -page 13 page 36 -page 43	1,30
A	MARTIN F ET AL: "Affinity selection of a camelized VH domain antibody inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 10, no. 5, mai 1997 (1997-05), pages 607-614, XP002117441 ISSN: 0269-2139 le document en entier	

-/--

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 03/03319

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>ARBABI GHAHROUDI M ET AL: "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 414, no. 3, 15 septembre 1997 (1997-09-15), pages 521-526, XP004261105 ISSN: 0014-5793 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>MUYLDERMANS S: "Single domain camel antibodies: current status." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. NETHERLANDS JUN 2001, vol. 74, no. 4, juin 2001 (2001-06), pages 277-302, XP002236934 ISSN: 0168-1656 cité dans la demande page 286, colonne de gauche, alinéa 3 -page 290, colonne de droite, alinéa 1; figure 5; tableau 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>WO 00/72880 A (SCHENK DALE B ;YEDNOCK TED (US); BARD FREDERIQUE (US); NEURALAB LT) 7 décembre 2000 (2000-12-07) page 68 -page 69</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,12-18
A	<p>WO 01/62801 A (VASQUEZ MAXIMILIANO ;BALES KELLY R (US); PAUL STEVEN M (US); DEMAT) 30 août 2001 (2001-08-30) exemple 2</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,12-18
A	<p>BARD F ET AL: "Peripherally administered antibodies against amyloid beta- peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 6, no. 8, août 2000 (2000-08), pages 916-919, XP002154518 ISSN: 1078-8956 cité dans la demande tableau 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,12-18
A	<p>FRENKEL D ET AL: "MODULATION OF ALZHEIMER'S BETA-AMYLOID NEUROTOXICITY BY SITE-DIRECTED SINGLE-CHAIN ANTIBODY" NEUROIMMUNOMODULATION, KARGER, BASEL,, CH, vol. 6, no. 6, novembre 1999 (1999-11), page 444 XP008000881 ISSN: 1021-7401 abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,12-18
	-/--	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 03/03319

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DUMOULIN M ET AL: "A single-domain antibody fragment that stabilises the native state of two amyloidogenic lysozyme variants and hence prevents aggregation." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 30, no. 3, 2002, page A93 XP002236935 676th Meeting of the Biochemical Society;Edinburgh, UK; April 08-10, 2002 ISSN: 0300-5127 abrégé</p>	1,12-18
A	<p>SOLOMON B: "Immunotherapeutic strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease." DNA AND CELL BIOLOGY. UNITED STATES NOV 2001, vol. 20, no. 11, novembre 2001 (2001-11), pages 697-703, XP002236936 ISSN: 1044-5498 page 701, colonne de gauche, alinéa 4 -page 702, colonne de gauche, alinéa 1</p>	1,12-18

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

demande internationale n°  
PCT/FR 03/03319

### Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°s  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n°s  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°s  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

### Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☒ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☒ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.



SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1 (en partie), 19-36

Utilisation d'anticorps à chaîne unique de camélidés dirigés contre des agents pathogènes ne sécrétant pas de toxines ou ne contenant pas la protéase NS3 de l'HCV pour la détection du dit agent pathogène. Fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigé contre des agents pathogènes ne sécrétant pas de toxines et capable de se lier à une molécule d'adhésion de la paroi bactérienne et plus particulièrement la phosphorylcholine. ADNc codant pour un tel fragment, vecteurs et cellules hôtes et compositions contenant un tel ADNc et/ou fragment variable ainsi que utilisations des dits fragments et ADNc.

2. revendications: 1 (en partie); 12-18

Utilisation d'anticorps à chaîne unique de camélidés dirigés contre le peptide bêta-amyloïde 1-42 pour la détection d'une maladie comprenant des dépôts de substance amyloïdes insolubles. Fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigé contre le peptide bêta-amyloïde 1-42. ADNc et banque d'ADNc codant pour un tel fragment, vecteurs et cellules hôtes et compositions contenant un tel ADNc et/ou fragment variable ainsi que utilisations des dits fragments et ADNc.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 03/03319

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP 0954978	A	10-11-1999	EP	0954978 A1	10-11-1999
			AU	2729599 A	27-09-1999
			WO	9946300 A1	16-09-1999
			EP	1062245 A1	27-12-2000
			US	6517829 B1	11-02-2003
WO 0065057	A	02-11-2000	AU	4120200 A	10-11-2000
			BR	0009866 A	08-01-2002
			CA	2370351 A1	02-11-2000
			CN	1351662 T	29-05-2002
			WO	0065057 A1	02-11-2000
			EP	1169453 A1	09-01-2002
			ID	30380 A	29-11-2001
			US	2003165511 A1	04-09-2003
			US	6528056 B1	04-03-2003
			ZA	200107822 A	23-09-2002
WO 03062415	A	31-07-2003	WO	03062415 A2	31-07-2003
WO 0072880	A	07-12-2000	AU	5303100 A	18-12-2000
			BG	106241 A	30-08-2002
			BR	0011000 A	19-02-2002
			CA	2370311 A1	07-12-2000
			CN	1359301 T	17-07-2002
			CZ	20013824 A3	13-11-2002
			DE	10084643 T0	11-07-2002
			EE	200100626 A	17-02-2003
			EP	1185298 A2	13-03-2002
			GB	2368794 A	15-05-2002
			HU	0201250 A2	28-08-2002
			JP	2003517461 T	27-05-2003
			NO	20015773 A	25-01-2002
			NZ	515403 A	28-05-2004
			SK	16982001 A3	06-11-2002
			TR	200103447 T2	22-04-2002
			TR	200202231 T2	21-11-2002
			WO	0072880 A2	07-12-2000
			US	6710226 B1	23-03-2004
			US	6750324 B1	15-06-2004
			US	6743427 B1	01-06-2004
			ZA	200109487 A	17-02-2003
WO 0162801	A	30-08-2001	AU	4178601 A	03-09-2001
			BR	0108676 A	07-01-2003
			CA	2400559 A1	30-08-2001
			CN	1426423 T	25-06-2003
			CZ	20022851 A3	17-09-2003
			DE	1257584 T1	28-05-2003
			EP	1257584 A2	20-11-2002
			ES	2184660 T1	16-04-2003
			HU	0204074 A2	28-03-2003
			JP	2003523764 T	12-08-2003
			NO	20023957 A	22-10-2002
			NZ	520800 A	30-04-2004
			SK	12212002 A3	07-10-2003
			TR	200202799 T3	21-03-2003
			WO	0162801 A2	30-08-2001